

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE MEDICINA
CARRERA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE BIOQUÍMICO CLÍNICO

TÍTULO

Validación del método ECLIA para cuantificación de tiroglobulina en solución de lavado de aguja de aspirado de punción ganglionar cervical en pacientes con cáncer de tiroides tipo papilar del Hospital Oncológico SOLCA, Núcleo-Quito, durante el periodo agosto-septiembre 2018

AUTOR

CARLA TAMARA SUASNAVAS ROSALES

DIRECTOR

Msc. CARLOS FERNANDO FLORES SAMPEDRO

QUITO, 2018

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Carla Tamara Suasnavas Rosales, C.I. 1714032495, autor del trabajo de graduación titulado “Validación del método ECLIA para cuantificación de tiroglobulina en solución de lavado de aguja de aspirado de punción ganglionar cervical en pacientes con cáncer de tiroides tipo papilar del Hospital Oncológico SOLCA, Núcleo-Quito, durante el periodo agosto-septiembre 2018”, previo a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICO CLÍNICO en la FACULTAD DE MEDICINA.

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos del autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.



Carla Tamara Suasnavas Rosales

C.I. 171403249-5

CERTIFICACIÓN

Certifico que la disertación de Bioquímica Clínica de la Srta. Carla Tamara Suasnavas Rosales sobre el tema **“Validación del método ECLIA para cuantificación de tiroglobulina en solución de lavado de aguja de aspirado de punción ganglionar cervical en pacientes con cáncer de tiroides tipo papilar del Hospital Oncológico SOLCA, Núcleo-Quito, durante el periodo agosto-septiembre 2018”**, ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas, por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



Carlos Fernando Flores Sampedro, Msc.

Director

Quito, 2018

DEDICATORIA

Con mucho cariño y estima,

A mis padres y abuelitos por ser mis eternos guías.
A Javier y Luciana por ser la inspiración de mis sueños.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por permitir mi existencia, por mantenerme fuerte en cada paso y por otorgarme la oportunidad de estudiar.

A mi familia y amigos por cada palabra de apoyo y confianza.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Medicina, Carrera de Bioquímica Clínica y a sus docentes por todos los conocimientos impartidos durante los años de estudio.

Al equipo del Laboratorio Clínico, Citológico del Hospital SOLCA-Núcleo de Quito por el apoyo técnico brindado durante el estudio, especialmente a mi director de trabajo de titulación, Dr. Carlos Fernando Flores Sampedro por confiar en este proyecto.

Carla Tamara Suasnavas Rosales.

RESUMEN

Introducción: El carcinoma papilar de tiroides constituye el 90% de las neoplasias de tiroides. Su caracterización involucra métodos de imagen y citología, siendo la PAAF (punción aspiración con aguja fina) una de las técnicas más útiles por tener una sensibilidad de 86.3%; el porcentaje restante se ve representado por el 4-9% de falsos negativos, 0-1% falsos positivos y entre el 2-28% los casos indeterminados. La medición de tiroglobulina en el líquido de lavado de la aguja con la cual se realizó el aspirado de ganglios cervicales se ha convertido en la base del seguimiento de los pacientes con carcinoma papilar de tiroides (CPT). Sin embargo, no existen datos referentes a la validación de métodos por el cambio de matriz, motivo por el cual este estudio evaluó características de desempeño analítico para el equipo Cobas e 601.

Metodología: En este estudio se determinó la linealidad del método de acuerdo con la guía EPO6-A del CLSI "*Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline*", se comprobó la precisión y la veracidad en base a la guía EP15-A3 del CLSI "*User Verification of Precision and Estimation of Bias; Approved Guideline—Third Edition*" y se realizaron estudios de interferencia utilizando la guía EP07-A2 del CLSI "*Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline—Second Edition*".

Resultados: Se validó el rango lineal de 0.5 ng/mL a 28.05 ng/mL, rango que involucra puntos de decisión clínica para CPT. Al cuantificar el analito tiroglobulina en la matriz lavado de aguja de aspirado ganglionar se demostró una desviación estándar en condiciones de repetibilidad de 0.032 ng/mL (< 0.035 ng/mL, valor estimado por el fabricante) y 0.110 ng/mL (< 0.111 ng/mL, valor del UVL) en condiciones de precisión intermedia. El método presentó un sesgo de 0.21 ng/mL, el cual fue estadísticamente significativo, pero clínicamente útil. La evaluación de la interferencia por hemólisis y por propiedades de la matriz permitió la recuperación de Tiroglobulina de acuerdo a lo estimado por el fabricante. **Conclusiones:** Se demostró que el equipo Cobas e 601 presenta características de desempeño aceptables para la medición de tiroglobulina en la matriz lavado de aguja de aspirado ganglionar en pacientes con carcinoma papilar de tiroides.

Palabras clave:

Validación; electroquimioluminiscencia; cáncer papilar de tiroides; PAAF; tiroglobulina; ganglios cervicales.

ABSTRACT

Introduction: The papillary thyroid carcinoma constitutes the 90% of the thyroid's neoplasia. Its characterization involves image methods and cytology, being the FNA (fine needle aspiration) one of the most useful techniques for having a sensitivity of 86.3%; the remaining percentage is represented by 4-9% of false negatives, 0-1% of false positives and between the 2-28% of indeterminate cases. The measurement of thyroglobulin in the needle wash fluid, from which the aspiration of the cervical lymph nodes was performed, has become the basis for following up of patients with papillary thyroid carcinoma (PTC). Nevertheless, there are no data referring to the Methods' validation due to matrix change. Reason by which, this studio evaluates the characteristics of the analytical performance for the Cobas e 601 equipment.

Methodology: In this studio, the linearity of the method was determined according to the CLSI EPO6-A guide "*Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline*", precision and accuracy were verified based on the CLSI EP15-A3 guide "*User Verification of Precision and Estimation of Bias; Approved Guideline—Third Edition*" and interference studies were conducted using the CLSI EP07-A2 guide "*Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline—Second Edition*".

Results: The linear range was validated from 0.5 ng/mL to 28.05 ng/mL, a range that involves clinical decision points for PTC. To quantify the thyroglobulin analyte in the washed lymph node fine-needle aspirate matrix, a standard deviation was demonstrated under repeatability conditions of 0.032 ng/mL (< 0.035 ng/mL, value estimated by the manufacturer) and 0.110 ng/mL (< 0.111 ng/mL, UVL value) under conditions of intermedia precision. The method presented a bias of 0.21 ng/mL, which was statistically significant, but clinically useful. The evaluation of the interference by hemolysis and by the properties of the matrix allowed the recovery of thyroglobulin according to the estimated by the manufacturer.

Conclusions: It was demonstrated that the Cobas e 601 equipment presents acceptable performance characteristics for the measurement of thyroglobulin in the matrix lymph node fine-needle aspirate washout in patients with papillary thyroid carcinoma.

Key words:

Validation; electrochemiluminescence; papillary thyroid carcinoma; FNA; thyroglobulin; lymph node.

TABLA DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN	I
CERTIFICACIÓN	II
DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTO.....	IV
RESUMEN.....	V
ABSTRACT	VI
LISTA DE ILUSTRACIONES	IX
LISTA DE TABLAS.....	X
LISTA DE ECUACIONES	XI
LISTA DE ANEXOS	XII
LISTA DE SIGLAS	XIII
CAPITULO I.....	1
1.1 Planteamiento del problema	3
1.2 Justificación	6
1.3 Objetivos.....	8
Objetivo general	8
Objetivos específicos.....	8
1.4 Limitaciones del estudio	8
CAPITULO II	10
MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL.....	10
2.1 Antecedentes	10
2.2 Marco teórico.....	14
2.2.1 Validación de métodos analíticos.....	14
2.2.2 Tipos de métodos	17
2.2.3 Electroquimioluminiscencia (ECL).....	18
2.2.4 Características de desempeño de un método.....	21
2.3 Marco conceptual	28
CAPITULO III.....	32
MARCO METODOLÓGICO	32
3.1 Diseño del estudio	32
3.2 Población.....	32
3.3 Muestra, tamaño muestral y selección	32
3.3.1 Muestra.....	32
3.3.2 Tamaño muestral	32
3.3.3 Selección de la muestra	33

3.4 Operacionalización de las variables	34
CAPÍTULO IV	74
RESULTADOS	74
4.1 ENSAYO DE LINEALIDAD.....	74
4.2 ENSAYO DE PRECISIÓN	84
4.3 ENSAYO DE ESTIMACIÓN DEL SESGO MEDIANTE LA PRUEBA DE MATERIALES CON CONCENTRACIONES CONOCIDAS.....	92
4.4 ENSAYO DE INTERFERENCIA.....	95
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	98
CONCLUSIONES	106
RECOMENDACIONES	107
BIBLIOGRAFÍA.....	108

LISTA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Distribución de los datos en el error aleatorio.	15
Ilustración 2. Distribución de los datos en el error sistemático.	15
Ilustración 3. Esquema que representa el error total.	16
Ilustración 4. Principio sándwich y formación de inmunocomplejos	19
Ilustración 5. Fundamento del método de electroquimioluminiscencia (ECL).	20
Ilustración 6. Curva Gaussiana.....	24
Ilustración 7. Descomposición de la varianza.	26
Ilustración 8. Criterios de calidad deseables para precisión (I), sesgo (B) y error total (TE).....	42
Ilustración 9. Estudio de linealidad para Tiroglobulina Sol-PAAF.	78
Ilustración 10. Estudio de linealidad para Tiroglobulina Sol-PAAF.	82
Ilustración 11. Gráfico de dispersión diseño 5 x 5. Nivel 1.2 ng/mL	85
Ilustración 12. Gráfico de dispersión diseño 5 x 5. Nivel 7 ng/mL	86
Ilustración 13. Interpolación en los valores de repetibilidad del fabricante.....	88
Ilustración 14. Interpolación en los valores de precisión intermedia del fabricante.	89

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Regresión polinómica	22
Tabla 2 Objetivos de calidad para Tiroglobulina	42
Tabla 3 Esquema de dilución para 11 niveles	48
Tabla 4 Materiales utilizados en la preparación de soluciones madre.....	49
Tabla 5 Esquema de dilución para 5 niveles	50
Tabla 6 Test de Grubbs para valores atípicos.....	57
Tabla 7 Reporte de precisión para Tg. Fabricante ROCHE.	58
Tabla 8 Información necesaria para el cálculo del sesgo.	62
Tabla 9 Resultados del estudio de linealidad para 11 niveles de concentración.	74
Tabla 10 Resumen de los resultados del análisis de regresión	76
Tabla 11 Estimación del grado de no linealidad	77
Tabla 12 Evaluación de las diferencias de repetibilidad en cada uno de los 11 niveles de concentración.....	79
Tabla 13 Resultados del estudio de linealidad para 5 niveles de concentración.	80
Tabla 14 Resumen de los resultados del análisis de regresión 5 diluciones.....	81
Tabla 15 Estimación del grado de no linealidad	82
Tabla 16 Evaluación de las diferencias de repetibilidad en cada uno de los 5 niveles de concentración.	83
Tabla 17 Diseño experimental 5 X 5. Resultados para el nivel de muestra 1.2 ng/mL.....	84
Tabla 18 Prueba de Grubbs para el diseño 5x5 a un nivel de muestra 1.2 ng/mL.....	84
Tabla 19 Diseño experimental 5 X 5. Resultados para el nivel de muestra 7 ng/mL.....	85
Tabla 20 Prueba de Grubbs para el diseño 5x5 a un nivel de muestra 7 ng/mL.....	86
Tabla 21 Resumen de los valores de ANOVA y estimaciones de imprecisión para Tg.....	87
Tabla 22 Valores de SD para repetibilidad. Datos del Fabricante (Inserto).....	88
Tabla 23 Valores de SD para precisión intermedia. Datos del fabricante (Inserto.)	88
Tabla 24 Comparación de las estimaciones de repetibilidad experimentales y reclamaciones del fabricante	90
Tabla 25 Comparación de las estimaciones de precisión intermedia experimental y reclamaciones del fabricante	90
Tabla 26 UVL como criterio de aceptación de la verificación.....	91
Tabla 27 Estimación del Sesgo con valores obtenidos en el estudio de precisión	93
Tabla 28 Estimación del Sesgo con valores de precisión del fabricante	94
Tabla 29 Resultados de la corrida analítica del nivel “control” y del nivel “prueba” para 4 ng/mL	96
Tabla 30 Resultados para el grupo control y el grupo de prueba nivel 4 ng/mL.....	96
Tabla 31 Resultados de la corrida analítica del nivel “control” y del nivel “prueba” para 1.3 ng/mL.....	97
Tabla 32 Resultados para el grupo control y el grupo de prueba nivel 1.3 ng/mL.....	97

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 1. Ecuación de óxido-reducción del complejo de rutenio	19
Ecuación 2. Desviación estándar absoluta (s).	24
Ecuación 3. Cálculo del coeficiente de variación.	25
Ecuación 4. Cálculo de la varianza.	25
Ecuación 5. Porcentaje de recuperación.....	26
Ecuación 6. Cálculo del error estándar de la media	63
Ecuación 7. Error estándar del material de referencia	63
Ecuación 8. Error estándar combinado	63
Ecuación 9. Cálculo del Tau	64
Ecuación 10. Intervalo de verificación.....	64
Ecuación 11. Estimación del Sesgo.....	64
Ecuación 12. Cálculo del número de réplicas	68
Ecuación 13. Diferencia Observada entre la muestra de prueba y de control.....	72
Ecuación 14. Punto de corte para rechazar o aceptar la hipótesis nula.....	72
Ecuación 15. Cálculo del Intervalo de Confianza del 95%.....	73

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Cronograma de trabajo	114
Anexo 2. Oficio CEISH SOLCA	115
Anexo 3. Oficio Ministerio de Salud Pública.....	116
Anexo 4. Consentimiento informado	119
Anexo 5. Técnica PAAF	122
Anexo 6. Alícuotas de solución salina al 0.9% y otras evidencias.....	123
Anexo 7. Certificado de calibración pipeta ACCUMAX PRO	125
Anexo 8. Certificado de calibración pipeta GILSON.	127
Anexo 9. Diagrama de flujo preanálisis	129
Anexo 10. Actividades realizadas en la fase de familiarización con el método	130
Anexo 11. Diagrama de flujo de la preparación del equipo Cobas e 601	132
Anexo 12. Registros generados en el proceso de validación.....	135
Anexo 13 Esquema de dilución.....	139
Anexo 14. Inserto del calibrador de tiroglobulina.....	140
Anexo 15. Diagrama de flujo para determinar la linealidad según guía EP06- A.....	141
Anexo 16. Determinación de los grados de libertad.....	143
Anexo 17. Determinación del factor F para el cálculo del UVL utilizando (df_R) y (df_{WL})	144
Anexo 18. Diagrama de flujo de la estimación de la precisión	145
Anexo 19. Reporte Unity para Tiroglobulina. Grupo Par	146
Anexo 20. Cálculo de los grados de libertad combinados.....	147
Anexo 21 Diagrama de flujo de la estimación del sesgo.....	148
Anexo 22 Resultados individuales de la regresión polinómica. 11 niveles.....	149
Anexo 23 Resultados individuales de la regresión polinómica. 5 niveles.....	150
Anexo 24 Los resultados individuales del ANOVA de una vía para la muestra 1.2 ng/mL y 7 ng/mL.....	151

LISTA DE SIGLAS

Tg: Tiroglobulina

CDT: Carcinoma Diferenciado de Tiroides

CPT: Carcinoma Papilar de Tiroides

US: Ultrasonografía

FNA: Fine Needle Aspiration

PAAF: Punción Aspiración Aguja Fina

GLC: Ganglios Linfáticos Cervicales

ATA: American Thyroid Association

Tg-SolPAAF: Tiroglobulina en solución de lavado obtenida por PAAF

UVL: Límite de Verificación

df_R : Grados de libertad para repetibilidad

df_{WL} : Grados de libertad para precisión intermedia

θ_R : Desviación estándar de repetibilidad del fabricante

θ_{WL} : Desviación estándar de precisión intermedia para el fabricante

se_{RM} : Error estándar del material de referencia

\bar{x}_{MR} : Media del material de referencia

SD_{MR} : Desviación estándar del material de referencia

$se_{\bar{x}}$: Error estándar de la media

Sec: Error estándar combinado

Df_c : Grados de libertad combinados

VI: Intervalo de Verificación

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

El término cáncer es genérico, hace referencia a varias neoplasias malignas que pueden afectar diferentes partes del cuerpo. El denominador común de esta patología es la proliferación descontrolada de células anormales con capacidad invasiva y con el cambio de fenotipo de una célula normal para convertirse en una célula neoplásica; su principal explicación es genética, en la que intervienen los protooncogenes- oncogenes y genes supresores. Los protooncogenes son genes expresados en diferentes etapas del ciclo celular, cuando existe una mutación en dichos genes estos se convierten en oncogenes que favorecen el crecimiento y metástasis celular. Los genes supresores en cambio intervienen en la muerte celular programada y la reparación del genoma.

La glándula tiroides se localiza en la parte anterior del cuello, constituida por dos lóbulos a cada lado de la tráquea, los cuales están unidos por el istmo. La unidad funcional de la glándula tiroides toma el nombre de folículo tiroideo, el cual está formado por células cúbicas foliculares que rodean al coloide que a su vez contiene a la tiroglobulina (Tg), una proteína de 660KD, cuya estructura es rica en el aminoácido tirosina por lo cual actúa como uno de los precursores de las hormonas tiroideas (encargadas de regular el metabolismo). La tiroides además presenta otro tipo de células llamadas C, que se encargan de secretar calcitonina cuya función es mantener el balance del calcio y fósforo. (Guyton, 2013);(Velasco et al., 2007). El cáncer de tiroides se origina en cualquiera de las células componentes del tiroides (célula folicular y célula C o parafolicular). (Velasco et al., 2007); (Granados, Takahashi, Huerta, & Aslan, 2014).

El cáncer diferenciado de tiroides (CDT) surge en las células epiteliales foliculares tiroideas. El cáncer papilar de tiroides (PTC) es una variante del CDT, este comprende cerca del 85% de los casos en relación con un aproximado del 12% que presentan histología folicular incluidos los convencionales y oncóticos (Carcinomas de células de Hurthle) y <3% que son tumores poco diferenciados. (Haugen et al., 2015)

Ente los objetivos básicos de la terapia inicial para pacientes con CDT está el mejorar la supervivencia global y específica de la enfermedad, además de disminuir el riesgo de

enfermedad persistente / recurrente y la morbilidad asociada, para lo cual se consideran varias opciones terapéuticas, entre las que se encuentra la tiroidectomía total o parcial de tiroides. El seguimiento de los pacientes post-operación se lo realiza con exámenes de ultrasonografía (US) con el fin de detectar enfermedad recurrente en los ganglios linfáticos del cuello. Los ganglios linfáticos monográficamente sospechosos deben ser sometidos a una FNA eco dirigida (Fine Needle Aspiration) de sus siglas en inglés o PAAF (Punción Aspiración Aguja Fina) de sus siglas en español. Se ha descrito que la medición de tiroglobulina en líquido de lavado de la aguja utilizada en la punción y el aspirado de los ganglios cervicales suele ser una opción viable para aumentar la sensibilidad de la citología por PAAF eco dirigida. (A.-L. Borel et al., 2008); (Giovanella, Bongiovanni, & Trimboli, 2013)

La ejecución de determinaciones cuantitativas de analitos considerados marcadores de ciertas patologías, repercuten en el entorno del diagnóstico clínico y de la salud pública. Actualmente existe una creciente exigencia social que reclama mayor calidad en los servicios sanitarios, por lo que los métodos de ensayo y laboratorio deben asegurar el máximo nivel de calidad técnica y científica en las determinaciones de sus analitos. En este sentido, el uso de normas y métodos de referencia es la elección correcta para asegurar la calidad, es tan cierta esta afirmación que de nada servirá el cumplimiento de otras características demandadas en el proceso de acreditación si no existe a la par la certeza que las pruebas diagnósticas son fiables.

El aseguramiento de la calidad se logra con procesos planeados, ejecutados, controlados medidos y mejorados continuamente. En efecto, para promover el cumplimiento de la calidad es importante contar con procesos estándar de laboratorio. Un ejemplo de proceso estándar es la validación de un método analítico, pues este brinda un protocolo regular y sistémico que define un conjunto estándar de procedimientos experimentales, modos estándar para la obtención de la muestra y el análisis, además de una manera estándar de juzgar el desempeño del método. (Westgard, 2013a).

1.1 Planteamiento del problema

De acuerdo al Registro Nacional de Tumores en Quito, en el último periodo en el que se encuentra información 2006-2010, la incidencia del cáncer de glándula tiroides (CGT) (tasas por cada 100 000 habitantes) corresponde al 23.5 para las mujeres, ocupando el tercer lugar luego del cáncer de mama y de piel y del 4.1 para los hombres, encontrándose en el lugar doce para este grupo, el primero y segundo lugar corresponde al cáncer de próstata y al de piel respectivamente (Sociedad de Lucha Contra el Cáncer/Registro Nacional de Tumores. Cueva, P; Yépez, J. editores., 2014); al comparar por género “La relación hombre/mujer es 1:10, es decir hay un varón por cada diez mujeres con CGT” (Sociedad de Lucha Contra el Cáncer/Registro Nacional de Tumores. Torres. C, 2014, p. 144). La importancia de mencionar a los varones pese a tener una menor tasa de incidencia radica en que esta población tiene peor pronóstico en relación con las mujeres. Información relevante expuesta a marzo de 2017 indicó que las cifras de incidencia relacionadas al CGT se han incrementado en el caso de mujeres, con una tasa de 31,0 y 4 para los hombres. La neoplasia maligna más frecuente en el país y el mundo corresponde al cáncer diferenciado de tiroides(CDT) que incluye sus variantes papilar y folicular, constituyendo el carcinoma papilar tiroideo (PTC) el 90% de las neoplasias de tiroides, pero que en general tiene un buen pronóstico especialmente en pacientes menores a 45 años. Mientras que el carcinoma folicular de tiroides hace metástasis a nivel de órganos distantes como pulmón o hueso, el carcinoma papilar de tiroides afecta a ganglios linfáticos cervicales (GLC) por medio de vasos linfáticos, del 27 al 46% son detectados durante el diagnóstico inicial y del 3 al 30% después de la cirugía, lo que significa que se debe realizar seguimiento a largo plazo para controlar la enfermedad y brindar el tratamiento oportuno.(Granados et al., 2014)(Li et al., 2013)(Konca, Yalcin, Cerit, & Ozkan, 2016).

La medición de los niveles séricos de Tg permite en cierto grado el monitoreo de pacientes en búsqueda de enfermedad residual por PTC. La presencia de Ac anti-Tg en pacientes en los cuales su patología quirúrgica de fondo indique la presencia de Tiroiditis de Hashimoto deben ser considerados como interferencia para los ensayos de Tg sérica. La mayor sensibilidad evidenciada para la Tg sérica se da tras la abstinencia de levotiroxina o tras la estimulación con TSH humana recombinante (rhTSH), sin embargo, puede que no se identifique a pacientes con cantidades relativamente pequeñas de tumor residual que a menudo se localizan en el cuello y que para estos casos solo el US de cuello ofrece una mejor oportunidad en el reconocimiento de enfermedad neoplásica. Un tumor agresivo o con poca diferenciación puede estar presente a

pesar de concentraciones bajas de Tg basal o estimulada (Haugen et al., 2015). La ecografía de cuello ultrasensible, prueba de imagen muy sensible para lesiones sospechas en la etapa de seguimiento de PTC, posee una baja especificidad por lo cual se complementa con el estudio citológico.(Leenhardt et al., 2013)(“Papillary and Follicular Thyroid Cancer | ThyCa: Thyroid Cancer Survivors’ Association, Inc.”, s/f).

La citología por aspiración con aguja fina (PAAF) como herramienta para confirmar o excluir la recurrencia de metástasis por CDT tiene una sensibilidad y especificidad del 87% y 76%, respectivamente, sin embargo, presenta problemas cuando el material obtenido no es suficiente o adecuado para el estudio citológico por escasa celularidad o muestreo no representativo sea por el tamaño de la metástasis o por la transformación quística, que en conjunto representan hasta el 30% de las muestras o errores técnicos.(Garagorri, 2002)(Li et al., 2016)(Feldkamp et al., 2016)(Seningen, Nassar, & Henry, 2012).

Desde hace algunos años se introduce una nueva herramienta, la cuantificación de tiroglobulina en la solución del lavado de la aguja fina con la que se realiza la punción-aspiración de ganglios linfáticos sospechosos, la misma que ya consta en las Guías de American Thyroid Association (ATA) y en el Consenso Europeo, en las que recomiendan la combinación de esta tiroglobulina (Tg) con la citología resultante de la aspiración con aguja fina en CDT. Recalcan que esta prueba puede ser útil sobre todo en los casos de lesiones quísticas en las que la citología y la ecografía pueden proporcionar resultados divergentes y de acuerdo con algunos estudios es válida incluso en pacientes con Ac anti-Tg circulantes (Gharib et al., 2016). La combinación de la técnica PAAF eco dirigida (Punción-aspiración con aguja fina) junto a la cuantificación de Tg en solución de lavado de aguja de la PAAF (Tg-SolPAAF) logra una sensibilidad diagnóstica para metástasis por carcinoma papilar de tiroides del 98% y una especificidad de entre el 96-100 % según diversos estudios. (Li et al., 2016)(Zhao et al., 2017)(Li et al., 2013).

Si bien los resultados obtenidos con esta herramienta adicional para el diagnóstico de PTC son prometedores, es necesario trabajar en la normalización de los procedimientos y realizar mayores esfuerzos para definir mejor los aspectos referentes a validación de métodos y control de calidad en las etapas de pre-análisis, análisis y post-análisis. Se disponen de escasos datos referentes a la estandarización de los métodos de cuantificación de (Tg-SolPAAF), varios autores mencionan que la matriz puede ser solución salina tamponada con fosfato o incluso el suero sin marcador proporcionado por el kit, pero es la solución salina al 0.9% la que aparentemente conserva las características de una muestra óptima. Sin embargo, el cambio de

matriz suero humano (para la cual fue validado el método de electroquimioluminiscencia del equipo Cobas e 601) por la matriz solución salina debe ser justificada con un desempeño analítico óptimo.

En este contexto, es evidente la necesidad de buscar respuestas a estos problemas, respuestas que están ligadas al Laboratorio Clínico, al ser su responsabilidad el asegurar la calidad de los servicios que presta, calidad concebida como parte del sistema de gestión de calidad del laboratorio, por lo tanto es una exigencia la validación de un método analítico en el laboratorio clínico con el fin de cumplir las necesidades metrológica de los valores de los analitos determinados por un método específico, sea para un método y analito de rutina o especial, y más aún cuando se introduce e implementa una nueva prueba. (“ISO 9000:2015(es), Sistemas de gestión de la calidad — Fundamentos y vocabulario”, s/f)(“ISO/IEC 17025 - General requirements for the competence of testing and calibration laboratories”, s/f).

El Laboratorio Clínico del Hospital Oncológico – SOLCA Núcleo Quito, no oferta esta prueba ni ha realizado estudios al respecto y es así como se plantea la posibilidad de iniciar los estudios preliminares respectivos sobre la validación del método para cuantificación de tiroglobulina en solución de lavado de aguja de punción-aspiración de ganglios linfáticos cervicales sospechosos de metástasis.

De lo anteriormente expuesto, surge la siguiente pregunta de investigación:

¿Los estudios de linealidad, precisión, sesgo e interferencia en el método ECLIA presentan una validez estadística que le permita cuantificar tiroglobulina presente en la solución del lavado de la aguja utilizada en la punción y el aspirado de ganglios cervicales en las condiciones técnicas del Laboratorio Clínico del Hospital SOLCA, Núcleo – Quito?

1.2 Justificación

La adecuada selección del método a ser validado depende de las necesidades médicas, del desempeño analítico y de los criterios prácticos. La selección de un método apropiado para un test de laboratorio clínico asegura una óptima atención al paciente. Los avances en la atención médica al paciente dependen del uso de pruebas de laboratorio nuevas o mejoradas. El uso que se le va a dar a la prueba (diagnóstico, seguimiento o screening) y la población a la cual va dirigida son la guía para determinar que parámetros de desempeño son importantes.

Existen varias razones por las cuales la medición de Tg-SolPAAF debe ser considerada una herramienta sensible y específica para la detección de metástasis en GLC en pacientes monitorizados por CDT. En lo referente a la sensibilidad, la Tg se encuentra en concentraciones muy altas en las vesículas tiroideas, tirocitos, como en su proximidad, lo que permite su cuantificación aun cuando no se encuentren células en la citología de PAAF (Van Herle, Vassart, & Dumont, 1979). En cuanto a la especificidad, se conoce que la expresión fisiológica del gen de la tiroglobulina está restringida a las células tiroideas foliculares y en tejidos metastásicos solo existe evidencia informada de la expresión de dicho gen en CDT. Si la población de estudio se limita a pacientes con tiroidectomía es evidente que la sensibilidad y especificidad pueden ser mejoradas.

Las investigaciones realizadas sobre la cuantificación de tiroglobulina en la solución de lavado de la aguja utilizada en la punción aspiración de un ganglio cervical concluyen que la Tg puede constituirse en un marcador altamente sensible en condiciones de metástasis cuando la población oncológica tiene antecedentes de cáncer de tiroides de tipo papilar, en contraste con la tiroglobulina sérica que es inespecífica para dicha patología (Velasco et al., 2007).

La implementación a futuro de la cuantificación de tiroglobulina en la solución de lavado obtenida de la aguja de aspirado de punción ganglionar cervical por ECLIA, en pacientes en los que se realiza el seguimiento por PTC, es un aporte trascendental para el Hospital Oncológico SOLCA, Núcleo-Quito, permitirá disminuir cirugías innecesarias al aumentar la sensibilidad y la especificidad de la PAAF al trabajarla en conjunto con la Tg de lavado, evitar el uso de marcadores moleculares como complemento del estudio histológico y la detección temprana de metástasis de PTC en ganglios linfáticos cervicales, disminuyendo por tanto los falsos positivos y los no diagnosticados que puede darse cuando se evalúan las herramientas

diagnósticas por separado (Li et al., 2016) (Zhao et al., 2017)(Moon et al., 2013)(Seningen et al., 2012)(Garagorri, 2002); además que podría permitir la disminución de costos en la atención a pacientes y en la economía de los mismos.

El presente estudio se justifica desde lo anteriormente expuesto, esto es la necesidad de iniciar un estudio para validar el método de ECLIA para la cuantificación de tiroglobulina en solución de lavado de aguja de PAAF, una justificación técnica implícita debido a las exigencias de los sistemas de gestión de calidad y de acreditación de la competencia técnica de los laboratorios clínicos, Norma ISO 15189, y ética pues el laboratorio debe responder con procedimientos y metodologías con probada validez técnica y clínica que permitan emitir diagnósticos médicos, rigurosos y confiables. La implementación de una nueva prueba analítica demanda la comprobación de los parámetros de desempeño analítico, con la finalidad de demostrar que el método de cuantificación del analito tiene un error total permitido aceptable, indicando que el valor obtenido de la medición de dicho analito refleja de la manera más cercana a lo real las condiciones de salud o enfermedad del paciente; tanto si se trata de validar métodos no normalizados como los normalizados pero que están siendo modificados significativamente o de verificarlos, además de la calificación del equipo y siempre de la mano del control de calidad. Además, la validación permite confirmar que los datos emitidos por el fabricante pueden ser reproducibles bajo condiciones propias de operación (equipo, calibradores, analista, etc.). (“Guia Técnica 1 validación de Métodos y determinación de la incertidumbre de la medición”, s/f).

1.3 Objetivos

Objetivo general

Determinar la validez del método de electroquimioluminiscencia (ECLIA) en el equipo Cobas e 601 para la cuantificación de tiroglobulina en solución de lavado de aguja de aspirado de punción ganglionar cervical en pacientes con cáncer de tiroides de tipo papilar del Hospital Oncológico SOLCA, Núcleo-Quito, durante el periodo agosto-septiembre 2018.

Objetivos específicos

- Validar el rango reportable para el método ECLIA en base a la guía EP06-A del CLSI con el propósito de conocer el rango en el cual los resultados son lineales debido a que el error no lineal es menor al objetivo de error.
- Comprobar la precisión del método en base a la guía EP15-A3 del CLSI a fin de estimar la variabilidad observada en la práctica.
- Realizar pruebas de recuperación utilizando la guía EP15-A3 del CLSI con el objetivo de estimar el sesgo del método.
- Realizar pruebas de interferencia sobre la base de la guía EP07-A2 del CLSI, con el fin de estimar el error sistemático constante.

1.4 Limitaciones del estudio

De acuerdo a lo descrito por Westgard,(2013), la organización experimental del plan de validación generalmente incluye 3 fases que buscan establecer los tipos de errores analíticos a ser evaluados: la familiarización con el método, los ensayos preliminares de evaluación, continuados con estudios más extensivos y profundos de precisión y exactitud.

Periodo de familiarización

- *Instaurar un procedimiento de trabajo*
- *Establecer /validar el rango reportable (linealidad)*
- Verificar el límite detección (caracterizar la sensibilidad analítica)

Ensayos preliminares de validación

- *Realizar ensayos de replicación intracorrida (imprecisión o error aleatorio)*
- *Realizar pruebas de interferencias (errores sistemático constante)*
- *Realizar pruebas de recuperación (error sistemático proporcional)*

Experimentos más extensivos y profundos, Se realizan cuando los experimentos preliminares demuestran que todo está aceptable.

- Realizar estudios de precisión total en el laboratorio
- Realizar estudios de comparación de métodos (inexactitud o error sistemático)
- Evaluar la aceptabilidad analítica del método
- Verificar los intervalos de referencia o puntos de corte
- Llevar una documentación de los estudios

En base a lo nombrado anteriormente y considerando los factores que han retrasado el desarrollo del presente estudio se ha decidido omitir varios ensayos y plantear el presente estudio como una investigación preliminar. Tal y como se describe en los objetivos del estudio, esta investigación se centra en la determinación del rango reportable, comprobación de la precisión y pruebas de interferencia y recuperación. Las limitaciones del presente estudio son:

- Impedimento para determinar la veracidad (error sistemático/inexactitud) usando un método de referencia que permita llevar a cabo el ensayo de comparación de métodos, descrito como un experimento extensivo y más profundo según Westgard, (2013). Sin embargo, la estimación de la veracidad se la realizó de acuerdo al protocolo EP15-A3.
- Debido a la complejidad metodológica y a la falta de estandarización de los criterios de la población participante en el ensayo para determinación de los valores para el punto de corte de la prueba de tiroglobulina medida en líquido de lavado de aguja fina, el presente estudio no realizará el ensayo mencionado, dejando la posibilidad de que se desarrolle en investigaciones futuras.
- La censura de datos menores a 0.04 ng/mL (límite de detección) por parte del software del equipo Cobas 6000 modular e 601, es un obstáculo en el desarrollo del ensayo de límite de detección y cuantificación, pues se debe estimar valores correspondientes al límite del blanco, el cual es menor a 0.04 ng/mL.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

2.1 Antecedentes

En referencia al control de calidad y específicamente de los elementos que pueden afectar el desempeño del método ECLIA para la determinación de tiroglobulina obtenida del líquido de lavado de aspirado ganglionar se menciona que una óptima estandarización de las fases preanalítica y analítica es la condición necesaria para obtener valores veraces de tiroglobulina (Giovanella et al., 2013). En un proceso de validación es importante considerar y controlar factores que pueden introducir una variabilidad significativa, el volumen de lavado más ampliamente utilizado es 1 mL, más el uso de volúmenes que van de 0.5 mL a 3 mL son mencionados por ciertos autores. Por su bajo costo y su fácil acceso la solución salina al 0.9 % corresponde a la solución de lavado descrita en la mayoría de las investigaciones. Se informa que la recolección más efectiva se da en un tubo primario, de plástico o de vidrio, sin aditivo, sin separador de suero, sin anticoagulante (principalmente heparina de litio). (Trimboli, D'Aurizio, Tozzoli, & Giovanella, 2017). Por otro lado, se sugiere transportar la muestra de 2-8°C. Datos expuestos por Boot, Mahon, Bramhall, & Clark, (2010) coinciden con indicaciones del fabricante en relación a la temperatura de conservación de las alícuotas, siendo esta de -20°C por un mes. En casos en los que la muestra no sea homogénea y presente material celular o particulado se debe realizar un pretratamiento (mezcla y centrifugación de la muestra) para eliminar desechos celulares. (Giovanella et al., 2014; Leenhardt et al., 2013) La mezcla en vórtex previo a su análisis son aspectos preanalíticos que tomar en consideración. (Boot et al., 2010)

Los experimentos preliminares descritos por Borel et al., (2008) demostraron una triple acción de bombeo de 1 mL de solución salina fue suficiente para lavar el 97% de Tg fuera de la aguja. La medición de Tg en un segundo lavado con 1 mL de solución salina de otro tubo mostró niveles de Tg < 3% de la Tg del primer lavado (55 000, 540 000 y 850 000 ng /solución de lavado en el primer lavado; 1500, 12 000 y 21 000 ng / solución de lavado en el segundo lavado, para cada paciente respectivamente).

Los efectos de matriz debido al cambio del medio en el que se mide el analito deben ser considerados en el proceso de cuantificación de Tg, al respecto Giovanella et al.(2013) explica que la solución utilizada para lavar la aguja se caracteriza por su pH, polaridad, partículas sólidas, propiedades fisicoquímicas que podrían inducir interacciones no específicas con los reactivos del kit, particularmente influir en la conformación de las estructuras del inmunoensayo u otro fundamento de ser el caso. En contraste, existe evidencia significativa en lo referente a los ensayos de interferencia, se menciona que para validar el uso de solución salina al 0.9% en lugar de la solución sin Tg del kit de medición, se midió la inmuno-radiactividad de la Tg en muestras que contenían solución libre de Tg, solución salina o solución salina complementada con 70 g / L de albúmina sérica humana, “ observamos que la inmunorreactividad de Tg estaba por debajo del límite de detección en cada muestra y concluimos que no debería haber ningún efecto de matriz en este ensayo relacionado con el uso de solución salina en lugar de un medio sin Tg para la dilución de los aspirados con aguja fina” (A.-L. Borel et al., 2008).

La población considerada en los estudios referentes a la cuantificación de Tg-SolPAAF de nódulos linfáticos en el cáncer de tiroides de tipo papilar no está estandarizada del todo. La característica reproducible en las investigaciones citadas posteriormente tiene en común el siguiente criterio de inclusión: pacientes con antecedentes de cáncer de tiroides tipo papilar sometidos a PAAF de ganglios linfáticos debido a sospecha de metástasis evidenciada en los hallazgos ecográficos. La presencia o ausencia de tejido tiroideo, presencia o ausencia de Ac anti-Tg, tratamiento con levotiroxina y tratamiento con yodo radiactivo entre otros, son algunos criterios considerados en la población de estudio con lo cual existe una gran variedad de resultados referentes al valor diagnóstico de la determinación de Tg-SolPAAF en las condiciones poblacionales expuestas.

La evaluación de la contaminación de la Tg-SolPAAF por Tg sérica en pacientes con CDT fue evaluada por Anne-Laure Borel et al., (2008). La hipótesis consideró el caso más desfavorable: que todo el material de aspiración obtenido por la técnica PAAF sea sangre. La cantidad de Tg sérica aspirada a través de la aguja se calculó como la concentración de Tg sérica (ng / mL) multiplicada por el volumen del material aspirado (mL), que para este estudio resultó ser <0.2 mL. En este contexto, se puede decir que para un paciente con Tg sérica de 20 ng / mL, el material de lavado presenta una contaminación por Tg sérica = $20 \times 0.2 = 4$ ng / en el volumen de lavado. Consideraron el valor de Tiroglobulina sérica de todos los pacientes que tenían Tg-

SolPAAF detectable y se realizó los mismos cálculos descritos, 15 pacientes tuvieron una o varias determinaciones de la Tg sérica, solo en 7 pacientes de los 15 se detectó Tg sérica en el rango de 0,4 a 29,2 ng / mL, mientras que las mediciones de Tg-SolPAAF estuvieron en el rango de 49 a 140 000 ng / mL. La contaminación máxima de Tg-SolPAAF por Tg sérica varió entre 0.003 y 0.012%, claramente no significativa en ningún paciente.

Konca et al., (2016) buscaron determinar el valor diagnóstico de Tg-SolPAAF y el efecto de los Ac anti-Tg. El método usado para la cuantificación de Tg-SolPAAF fue quimioluminiscencia. Se menciona que los pacientes podían haber sido sometidos o no a una tiroidectomía total, ablación radiactiva con yodo y toma de levotiroxina para supresión de la TSH para ser incluidos en el estudio; los resultados encontrados indican que un valor de Tg-SolPAAF ≥ 1 ng / mL tiene un poder diagnóstico mayor, independientemente de Ac anti-Tg (+) en pacientes con PTC. Sin embargo, Shin et al. (Shin et al., 2015) describe que en una población con tiroidectomía bilateral y terapia de ablación con yodo los Ac anti-Tg pueden influir en la medición de Tg-SolPAAF.

El artículo publicado por Martins et al.(2017) hace referencia al uso del método ECLIA en la valoración de Ac anti-Tg medidos en el líquido del lavado de aguja. El autor señala que los Ac anti-Tg presentes en fluidos de lavado pueden ser el resultado de una síntesis activa de estos en los ganglios linfáticos o pueden ser el resultado de la contaminación del líquido de lavado con sangre. Para el análisis de los dos criterios mencionados anteriormente, se midieron Ac anti-Tg en líquido de lavado de aguja utilizada en la punción (Ac anti-Tg-SolPAAF) en pacientes con autoanticuerpos positivos y negativos, el resultado fue que todas las muestras de líquido de lavado de aguja fueron negativas para Ac anti-Tg, lo que concuerda con resultados de otros estudios que señalan que los valores altos de Tg en ganglios metastásicos saturan los puntos de unión con los autoanticuerpos, por lo que estos no son interferentes directos. (Boi et al., 2006).

Li et al.,(2013) describieron el uso del método de inmunoensayo por quimioluminiscencia. Este estudio demostró que la Tg-SolPAAF tiene un alto valor predictivo negativo de (93-99%). El mencionado autor señala además que el valor promedio máximo de Tg-SolPAAF que se pudo observar en pacientes con PTC y ganglios metastásicos positivos fue de 1305.5 ng / mL.

Zhao et al.,(2017) determinaron Tg-SolPAAF utilizando el método ECLIA (Cobas e 601,

Roche Diagnostics Mannheim, Alemania). En esta investigación se buscó determinar el punto de corte para Tg de lavado de acuerdo con la influencia de la presencia/ausencia de la glándula tiroides. El rendimiento diagnóstico de la citología de PAAF por si sola presentó una sensibilidad del 89.2% con una especificidad del 100% en el diagnóstico de metástasis por CPT; la combinación de la Tg-SolPAAF y la citología del PAAF obtuvo una sensibilidad del 99.1% y una especificidad del 100%, el punto de corte fue: 55.09 ng/FNA para los pacientes con tiroides y 9.71 ng/FNA en los pacientes atiroideos. La publicación realizada por Moon et al.,(2013) demostró que el valor de corte para Tg-SolPAAF en pacientes con PTC es de 1.0 ng/mL. La American Thyroid Association (ATA) describe puntos de corte para CDT. Los valores pueden ser interpretados como:

- "Tg alta" "positivos", para valores por encima de 10 ng / FNA.
- "Tg baja" "comparar con los resultados de la citología", para valores que son detectables en un rango de 1-10 ng / FNA.
- "Tg indetectable" "normal", para valores por debajo de 1 ng / FNA. (Haugen et al., 2015).
- Se recomienda usar la nomenclatura ng/FNA, porque corresponde a la cantidad de Tg presente en la solución de lavado.

La variación de puntos de corte es clara y es una limitante en la valoración del desempeño analítico a una concentración de tiroglobulina ganglionar. Sin embargo, los resultados del metaanálisis realizado por Grani & Fumarola, (2014) mencionan que ocho estudios estiman el punto de corte óptimo entre 0.9 ng/mL y 1.1 ng/mL con una sensibilidad agrupada de 94.8% y una especificidad agrupada de 91.2 %. Este antecedente indica que la evaluación de las características de desempeño del equipo Cobas e 601 deben considerar el intervalo descrito anteriormente.

La Entidad de Acreditación Mexicana (EMA), en su "Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativo empleados por el laboratorio clínico", 2008, especifica los pasos para el aseguramiento de la calidad de las mediciones como parte de los procesos de validación y verificación de los procedimientos y métodos.

Mientras que el Servicio de Acreditación Ecuatoriano (SAE), puntualiza en su Guía de validación de métodos de ensayo en laboratorios clínicos 2011, la importancia de validar un

método en un laboratorio clínico con el fin de demostrar su competencia técnica con el único propósito de asegurar la “validez” de los resultados emitidos.

Los parámetros básicos considerados en un proceso de validación son: imprecisión, veracidad, especificidad, linealidad, límite de cuantificación y límite de detección. El desarrollo de la parte experimental de dicho proceso se basa en el cumplimiento de una serie de ensayos que permitan evaluar el método. La determinación del valor de decisión clínica o punto de corte de la prueba no es considerada un parámetro que permita evaluar el método, por lo que este debe realizarse siempre que el desempeño del método sea aceptable. (Westgard, 2013a)

2.2 Marco teórico

2.2.1 Validación de métodos analíticos

Según la norma ISO 9000, la validación de un método hace referencia a la ratificación, a través de evidencia objetiva, de que los requerimientos exigidos para el uso específico de dicho método se han cumplido. (“ISO 9000:2015, Sistemas de gestión de la calidad — Fundamentos y vocabulario”, s/f).

El concepto de validación incluido dentro de la norma ISO/IEC 17025, lo concibe como la confirmación, a través del estudio y contribución de evidencias objetivas, de que el método cumple con los requisitos de desempeños para su uso previsto. (“ISO/IEC 17025 - General requirements for the competence of testing and calibration laboratories”, s/f).

En base a estas definiciones se puede recalcar que: 1) Su aplicabilidad se centra en procedimientos de medida. 2) La validación requiere requisitos preestablecidos y con un fin previsto. En general su misión gira en torno al cumplimiento de parámetros de desempeño.

2.2.1.1 Propósito de la validación de métodos

El propósito verdadero de la validación de métodos es la identificación y **evaluación de errores** de una prueba medida por un método de laboratorio usando la estadística. La importancia de la validación es tal, que esta puede ser considerada como el pilar que sustenta la obtención e interpretación de los resultados en base a la magnitud de un error. (Westgard, 2013a)

Error aleatorio: Es un error imposible de controlar, identificar y corregir del todo durante la medición. Puede ser positivo o negativo. Al error aleatorio se lo relaciona con la imprecisión por lo cual puede ser estimado por la desviación estándar y su magnitud máxima puede considerarse como 2 o 3 desvíos estándar. (Westgard, 2013). (CLSI document EP05-A3, 2014)



Ilustración 1. Distribución de los datos en el error aleatorio.

Tomado de (Westgard, 2013b)

Error Sistemático: Es aquel error de medición que se mantiene o varía predeciblemente en todas las mediciones. Hay un desplazamiento de la media en relación a su valor original. Se evidenciará que todos los valores son altos o todos los valores son bajos. El error sistemático está relacionado con la inexactitud por lo cual la estimación de cuanto se desplaza la media o de cuanto tan altos o tan bajos son los valores se lo puede estimar con el sesgo. El error sistemático puede ser de dos tipos: error sistemático constante y error sistemático proporcional. Todos los errores pueden ser reconocidos cuando se compara con un valor considerado como verdadero. Así la ilustración 6 muestra como los diferentes tipos de errores pueden ser revelados cuando se realiza un estudio de comparación de métodos. (Westgard, 2013).

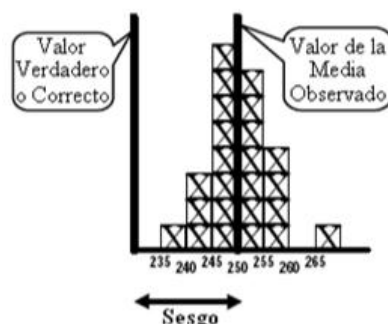


Ilustración 2. Distribución de los datos en el error sistemático.

Tomado de (Westgard, 2013)

Error total: Corresponde al efecto combinado de la dispersión observada (error aleatorio, relacionado con la imprecisión) y un componente de sesgo (errores sistemáticos, relacionados con la inexactitud), que en conjunto corresponde a la inexactitud.

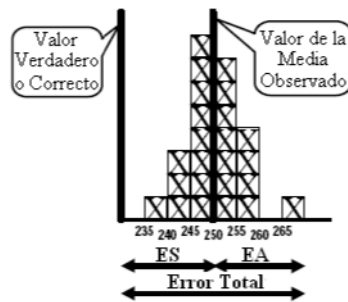


Ilustración 3. Esquema que representa el error total.

Tomado de (Westgard, 2013)

2.2.1.2 Tipos de validaciones

Según los requerimientos del método que se desea validar, se establecen los alcances de validación. El laboratorio debe conocer bien el método a validar y su aplicabilidad. (analito, concentración, matriz, etc.)

- **Validación primaria:** Es un proceso de exploración que busca conocer los límites operacionales y definir los parámetros de desempeño de un método nuevo o modificado. Esta corresponde a la validación que debe hacerse inicialmente en los laboratorios o casas comerciales cuando se quiere integrar una prueba nueva o técnica de uso interno que el propio laboratorio está implementando. (Camaró et al., 2015)
- **La validación secundaria, revalidación o verificación:** Se la realiza cuando el laboratorio quiere replicar un método que se ha implementado en otro lugar, por ello, esta validación pretende reunir evidencia objetiva que demuestre que se puede cumplir con las especificaciones de la validación primaria de acuerdo con las condiciones de trabajo del laboratorio que pretende realizarla. Se la realiza cuando se introduce un equipo diagnóstico, método o prueba que ya está validado por un organismo internacional. (Camaró, Catalá, Martínez, & Olmos, 2013)

2.2.2 Tipos de métodos

La ENAC los clasifica en 4 tipos de acuerdo con las exigencias de la validación.

- **Métodos Normalizados (Tipo I):** Son métodos que están validados por una entidad encargada de la normalización y son utilizados como métodos de referencia pues son usados para evaluar a otros. La entidad puede ser internacional (ISO), regionales (normas europeas), o nacionales (OAE, IRAM, etc). No requieren una validación completa, pero sí una verificación para asegurar el cumplimiento de las especificaciones de validación, pues se supone que estos han cumplido con todos los aspectos referentes a la validación primaria.
- **Métodos alternativos al método de referencia (Tipo II):** Estos métodos se han validado mediante la comparación con el método considerado de referencia, de acuerdo con un estándar aceptado, los cuales son considerados equivalentes al método de referencia por una organización técnica competente. En esta categoría suelen incluirse los métodos desarrollados por los fabricantes de equipos.
- **Métodos Normalizados con modificaciones o basados en métodos de referencia (Tipo III):** Estos métodos están basados en métodos de referencia y no presentan una modificación que ponga en duda la validez operacional del método, como sería el uso de otros controles, condiciones instrumentales, otras muestras, diferentes tiempos y temperaturas de incubación. No precisan de una validación completa, pero sí la comprobación de su correcto funcionamiento.
- **Otros métodos (Tipo IV):** Estos métodos son los desarrollados por el propio laboratorio; deben ser validados para demostrar el cumplimiento de los parámetros de aceptación que permiten su aplicación. Una vez está en uso el método, se realizará una verificación del desempeño contra los parámetros de validación, con el propósito de indicar que aún se domina el ensayo.

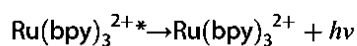
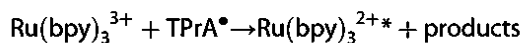
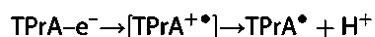
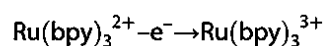
2.2.3 Electroquimioluminiscencia (ECL)

La electroquimioluminiscencia es un método de cuantificación de señales luminiscentes resultantes de la conversión de energía electroquímica en energía radiactiva. Las señales luminiscentes se obtienen cuando el estado excitado de la especie interviniente en la reacción no puede mantenerse estable y decae hasta el estado fundamental con la emisión de un fotón de cierta magnitud (Wei & Wang, 2011). Se sabe que los procesos de electroquimioluminiscencia ocurren con ciertas moléculas que pueden ser clasificadas de acuerdo a su naturaleza química: (a) complejos de metales de transición; (b) moléculas orgánicas. El ECL del complejo tris(bipiridil)-rutenio (II), por ser un método de detección altamente sensible ha recibido considerable atención para el desarrollo de los inmunoensayos. (Roche Diagnostics, s/f)

2.2.3.1 Uso del complejo de Rutenio

El mecanismo ECL del complejo de Rutenio ha sido ampliamente estudiado. Tres mecanismos diferentes se han propuesto: la ruta oxidativa-reductiva; la ruta reductiva-oxidativa y la vía “hot electron- induced”. Las mayores aplicaciones del complejo $Ru(bpy)_3^{2+}$ se basa en la vía oxidativa-reductiva, donde $Ru(bpy)_3^{2+}$ es un luminóforo para la emisión de luz y tri-n-propilamina (TPrA) es el co-reactante. (Richter, 2004); (Wei & Wang, 2011)).Ambas sustancias permanecen estables mientras no se aplique un voltaje al sistema. La reacción ECL del $Ru(bpy)_3^{2+}$ y la (TPrA) se lleva a cabo en la superficie del electrodo de platino en donde se da la reacción de los compuestos por la aplicación de voltaje.

La oxidación de la (TPrA) tras la liberación de un e^- da lugar a un compuesto catiónico transitorio $(TPrA)^{+o}$, que posteriormente libera un protón (H^+) y da lugar al radical $(TPrA)^o$. Así también, el $Ru(bpy)_3^{2+}$ libere un e^- y se oxide a $Ru(bpy)_3^{3+}$. El radical $(TPrA)^o$ reacciona con el complejo de $Ru(bpy)_3^{3+}$ provocando que el complejo de rutenio se reduzca a $Ru(bpy)_3^{2+*}$, que corresponde al estado excitado e inestable del complejo, la liberación de un fotón de 620 nm es el resultado del paso del estado excitado al estado fundamental del complejo, tal y como se describe en la figura 1. (Wei & Wang, 2011). La TPrA se consume en el proceso y, por lo tanto, debe estar presente en exceso. El complejo de rutenio en estado basal $Ru(bpy)_3^{(2+)}$ se regenera durante la reacción.



Ecuación 1. Ecuación de óxido-reducción del complejo de rutenio

Tomado de (Bard, 2004; Richter, 2004)

2.2.3.2 Principio del test

El principio del test de Tiroglobulina corresponde a una técnica sándwich con una duración total de 18 minutos. Las soluciones de trabajo necesarias para llevar a cabo la cuantificación de este analito son: (a) solución con partículas recubiertas de estreptavidina. (b) solución con anticuerpos monoclonales biotilados anti-Tg. (c) solución con anticuerpos monoclonales anti-Tg marcados con un complejo de rutenio. La reacción tiene lugar en una cubeta de ensayo, en donde 35 μL de muestra del paciente se combina con un reactivo que contiene anticuerpos con biotina anti-Tg y con otro reactivo que contiene un anticuerpo marcado con rutenio. Durante un paso de incubación de 9 minutos, los anticuerpos capturan la Tg presente en la muestra. El inmuno-complejo está constituido por el anticuerpo biotilado, la Tg presente en la muestra y el anticuerpo marcado con rutenio. Un segundo paso tiene lugar en esta reacción, micropartículas paramagnéticas recubiertas de estreptavidina son añadidas al complejo sándwich con el fin de unirse con el anticuerpo que contiene biotina, antes de completarse la segunda incubación de 9 minutos, la pipeta de aspiración aspira ProCell (solución de tripopilamina, TPA) hacia la célula de medición para prepararla y facilitar la medida. Al finalizar la segunda incubación la pipeta aspira la mezcla de reacción desde la cubeta de ensayo y la transfiere a la célula de medición.

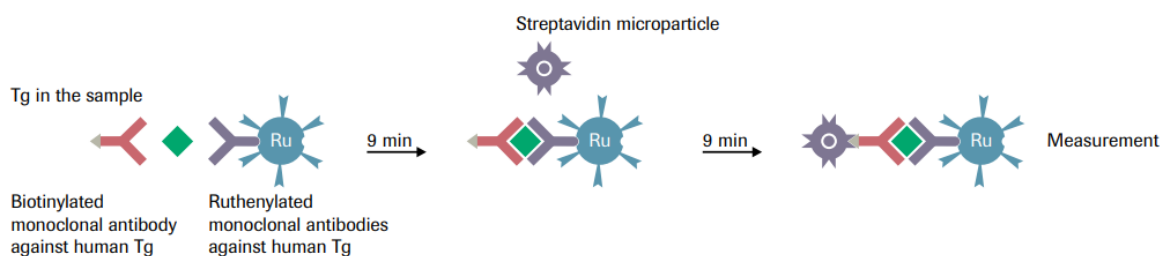


Ilustración 4. Principio sándwich y formación de inmunocomplejos

Tomado de (Roche Diagnostics, s/f)

En la célula de medición tiene lugar los siguientes pasos: (a) Los complejos inmunes quedan atrapados magnéticamente sobre el electrodo de trabajo por la interacción con las micropartículas paramagnéticas de estreptavidina. (b) la pipeta de aspiración aspira ProCell de nuevo para eliminar los constituyentes de reactivo y muestra no unidos. (c) tiene lugar la reacción ECL en la célula de medición tal y como se describió en la **Ecuación 1**. La emisión de luz se mide con un fotomultiplicador. La cantidad de luz generada es directamente proporcional a la cantidad de Tg presente en la muestra. La valoración y el cálculo de la concentración del analito se realiza mediante una curva de calibración. Una vez terminada la medición, las micropartículas paramagnéticas son lavadas de la superficie del electrodo con una solución de limpieza (CleanCell). La variación del potencial del electrodo permite que la superficie de la célula de medición se regenere para otra medición. **Ilustración 5**.

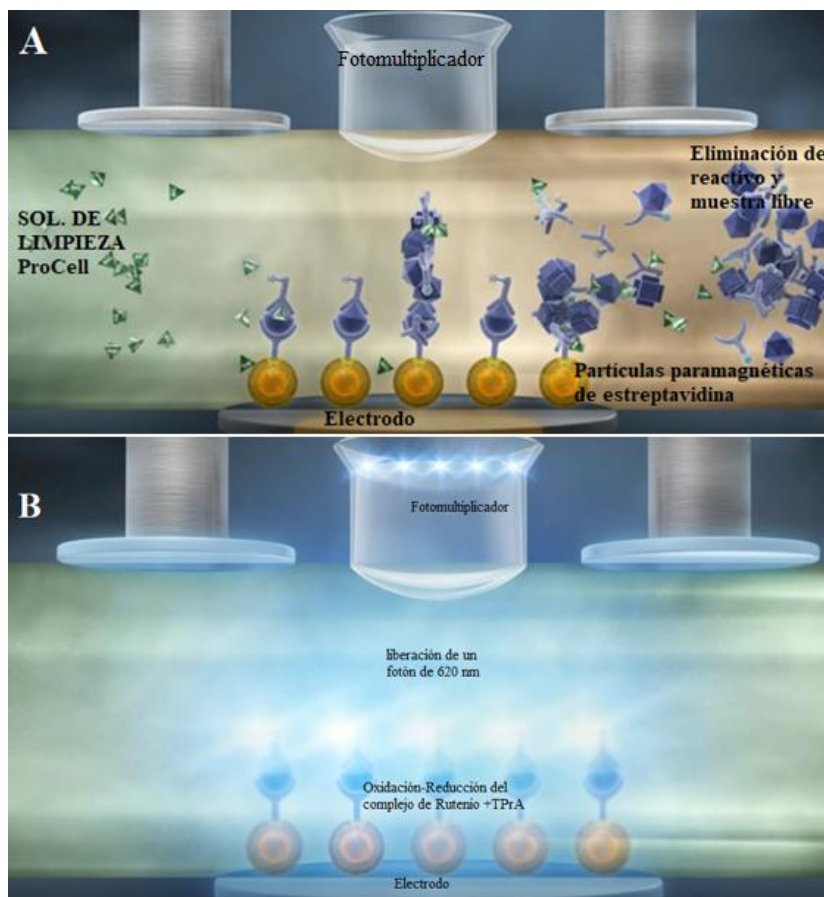


Ilustración 5. Fundamento del método de electroquimioluminiscencia (ECL).

Tomado de (Roche Professional Diagnostics, s/f)

2.2.4 Características de desempeño de un método

2.2.4.1 Linealidad

Se entiende como la capacidad de un método analítico de proporcionar valores estrechamente relacionados con la concentración del analito dentro de un rango de concentraciones, de tal manera que existe una relación proporcional entre la variable concentración del analito presente en la matriz y la variable respuesta del método. Se cree que la linealidad no es necesaria para métodos como los inmunoensayos competitivos, puesto que la relación existente entre la señal de respuesta y la concentración del analito es intrínsecamente no lineal, en contraste a esta afirmación se describe que la relación matemática entre las dos variables debe ser definida para permitir la interpolación de puntos y la elección de una transformación adecuada de la curva dosis-respuesta en forma lineal. Es importante que la linealidad abarque los puntos de decisión clínica, entendiéndose estos como los valores del analito en los cuales el médico toma la decisión de dar o no tratamiento. Al valor mínimo y máximo de un analito compatible con la vida se lo llama rango reportable, este no necesariamente concuerda con el intervalo lineal (linealidad) pero si es considerado una parte de este. (CLSI document EP06-A., 2003)

El enfoque utilizado en la guía EP06-A, corresponde al método polinomial propuesto por Kroll, el cual representa un proceso estadístico que permite conocer la (s) concentración (es) en la (s) cual (es) el método carece de linealidad y la magnitud de no linealidad en ese nivel de concentración. Sin embargo, no identifica las causas de la no linealidad significativa. La necesidad de establecer los requisitos de error debido a la no linealidad es un aspecto relevante descrito en la versión actual de la guía. Este método estadístico exhibe a la linealidad y a la no linealidad como dos modelos alternativos y plantea un patrón paramétrico para la opción no lineal. El protocolo busca evaluar la linealidad aislada de las condiciones de precisión y veracidad tanto como sea posible, pero considera a la falta de precisión como un obstáculo para este método estadístico por lo que incluye una verificación de la repetibilidad. La evaluación experimental de la linealidad requiere como mínimo cinco soluciones de concentraciones diferentes ejecutadas al menos por duplicado. Los niveles y las réplicas varían de acuerdo al propósito, así:

- Verificar los valores descritos por el fabricante (5-7 niveles y 2 réplicas).
- Establecer el rango lineal de métodos nuevos o modificados (7-11 y 2-4 réplicas según la imprecisión esperada).

Regresión polinómica

El análisis de regresión polinomial para polinomios de primer, segundo y tercer orden busca encontrar una recta o una curva que se aproxime de mejor manera a los datos con el fin de interpolar un valor desconocido. El diseño experimental examina si un polinomio no lineal se ajusta mejor a los datos que un polinomio lineal. Si el polinomio no lineal se ajusta mejor que el polinomio lineal se evalúa si la diferencia entre el polinomio lineal y el no lineal que mejor se ajusta es < el sesgo permisible para el método (objetivo de error no lineal).

Tabla 1
Regresión polinómica

Orden	Polinomio a	Regresión df (Rdf) b
Primero	$y = b_0 + b_1x$	2
Segundo	$y = b_0 + b_1x + b_2x^2$	3
Tercero	$y = b_0 + b_1x + b_2x^2 + b_3x^3$	4

Número de coeficientes en el modelo de regresión incluido b_0 .

^b Grados de libertad consumidos en el análisis de regresión

Tomado de: (CLSI document EP06-A., 2003)

El modelo de primer orden es una línea recta. El modelo de segundo orden describe una relación curva/ parábola. El modelo de tercer orden es aplicable a situaciones en las que existe un cambio en todos los niveles. Los coeficientes de regresión descritos en las ecuaciones están etiquetados como b_i . En el modelo de segundo orden, b_2 es el coeficiente no lineal; en el modelo de tercer orden, b_2 y b_3 son coeficientes no lineales.

2.2.4.2 Precisión

La precisión es el grado de concordancia existente entre los valores analíticos de ensayos independientes obtenidos del estudio de un método, el cual es aplicado repetidamente sobre partes representativas de una misma muestra. Indica el error aleatorio de un método. La precisión de un método considera 3 parámetros importantes:

Repetibilidad del método: Antes denominada precisión dentro de la corrida. Es un parámetro de medida de la variación de un método. Se puede calcular con la SD obtenida de una serie de

repeticiones de una muestra dada en una sola ejecución y bajo las mismas condiciones de trabajo y ambiente. Refleja la máxima precisión que el método puede alcanzar, o lo que es lo mismo, refleja resultados con una imprecisión mínima (ruido del ensayo). El procedimiento de medición, el operador, las condiciones de operación y el laboratorio son variables constantes con el fin de replicar medidas en la misma muestra o muestras similares durante un corto periodo de tiempo. Se obtiene un resultado por cada copa de muestra. (CLSI document EP15-A3, 2014)

Precisión dentro del laboratorio: Corresponde a un tipo de precisión intermedia pues indica el grado de concordancia de resultados obtenidos en ensayos mutuamente independientes aplicados a alícuotas de la misma muestra, en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones. Las condiciones de precisión intermedia incluyen ciertas características de reproducibilidad y repetibilidad. Para la modificación de las condiciones de operación se debe tener en cuenta: tiempo, calibración, operador y equipo (CLSI document EP05-A3, 2014).

Reproducibilidad: Es la concordancia existen entre los valores obtenidos de las mediciones de un mismo mensurando cuando el método es aplicado por analistas distintos, en laboratorios diferentes y en días distintos. Refleja la máxima dispersión de un mismo proceso analítico (CLSI document EP05-A3, 2014).

Variabilidad y fuentes de variación

Los procedimientos cuantitativos de laboratorio clínico definen la variabilidad cuando obtienen mediciones repetidas, sea el caso del control de calidad interno, las pruebas de competencia externa e incluso experimentos de repetibilidad sencillos. El objetivo es identificar la dispersión de los puntos para evidenciar la imprecisión del ensayo en la concentración evaluada. La variabilidad para una serie de resultados generados durante un periodo de tiempo importante se puede cuantificar aplicando cálculos de la media y la SD. Sin embargo, la varianza es una medida de dispersión más útil cuando se combinan estimaciones de precisión. Generalmente en la mayoría de los ensayos existe menos variabilidad en una sola ejecución en relación a la variabilidad presente en varias ejecuciones exhibidas en un control de calidad o en una prueba de competencia entre laboratorios. Se espera estas tendencias debido a la existencia de mayores fuentes de variación dentro y fuera del laboratorio que dentro de una corrida analítica. Por lo expuesto, el procesamiento de los datos resultantes de un estudio de precisión sea cual sea su

enfoque se basa en el uso de un **ANOVA**. Se aplica un ANOVA de una vía si el experimento se lo realiza en 5 días con 5 réplicas por día como se menciona en CLSI document EP15-A3, (2014), o un ANOVA anidado si el estudio corresponde a un experimento 20*2*2 como el descrito en CLSI document EP05-A3, (2014). En todos los casos es necesario una formulación simbólica para tratar las fuentes de variación que contribuyen a los resultados. Es así que el resultado individual correspondiente a una sola réplica puede describirse como la media para esa muestra más efectos aleatorios porque las desviaciones se deben a factores distintos como las variaciones entre días, entre corridas/ejecuciones y dentro de la corrida dada por las réplicas (es decir, “error residual” o “ruido del procedimiento de medición”) según sea el enfoque utilizado.

Desviación estándar absoluta (SD) Es la medida de la dispersión de un conjunto de datos alrededor de la media. Su ecuación corresponde a:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} = \sqrt{\frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + \dots + (x_n - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Ecuación 2. Desviación estándar absoluta (s).

x_i : observación individual; \bar{X} : Es el promedio de todas las observaciones; n : total de la población

Cuando se utiliza la desviación estándar para describir un conjunto de datos, nace la idea de “Curva de distribución normal o Gaussiana”, cuya característica es presentar una distribución simétrica en forma de campana. (Botella, 2013);(Westgard, 2013a).

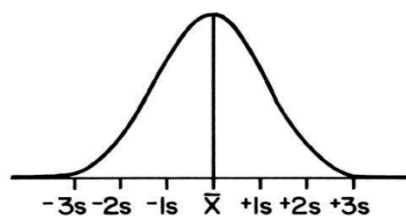


Ilustración 6. Curva Gaussiana.

El 68.2 % de las observaciones están dentro de +/- 1(s) en relación con la media, 95.5 % de las observaciones en +/- 2 (s) en relación con la media, y 99.7% dentro de +/- 3(s) de la media poblacional.

Coefficiente de variación (CV): Es una medida de dispersión, expresa la desviación estándar como un porcentaje de la media. Este indicador se justifica en el uso de variables con valores mayores (en las que su media será mayor) o variables con valores dispersos (en las que su desviación estándar será mayor); al expresar el cociente de la desviación estándar y la media, se anula todo posible efecto permitiendo la comparación de la variabilidad en otras escalas. (Botella, 2013);(Westgard, 2013a).

$$CV(\%) = \frac{sd}{\bar{x}} \times 100$$

Ecuación 3. Cálculo del coeficiente de variación.

Tomado de:(Botella, 2013)

Varianza (s²): Corresponde al cuadrado de la desviación estándar. Valores mayores de varianza corresponden a muestras que presenta mayor variabilidad. (Botella, 2013);(Westgard, 2013a).

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} = \frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + \dots + (x_n - \bar{x})^2}{n - 1}$$

Ecuación 4. Cálculo de la varianza.

Tomado de:(Botella, 2013)

La descomposición de la varianza corresponde a la suma vectorial de las desviaciones en relación a la media muestral por el efecto combinado de las fuentes de desvío aleatorias como son: variación entre días, entre corridas y dentro de la corrida según sea el enfoque utilizado. Esto se representa en la siguiente ilustración, así las flechas de una sola dirección representan la magnitud y la dirección de las desviaciones generales (totales) y de tres fuentes específicas de desviación, las flechas delgadas y de dos cabezas representan las magnitudes de las respectivas SD.(CLSI document EP05-A3, 2014, p. 05)

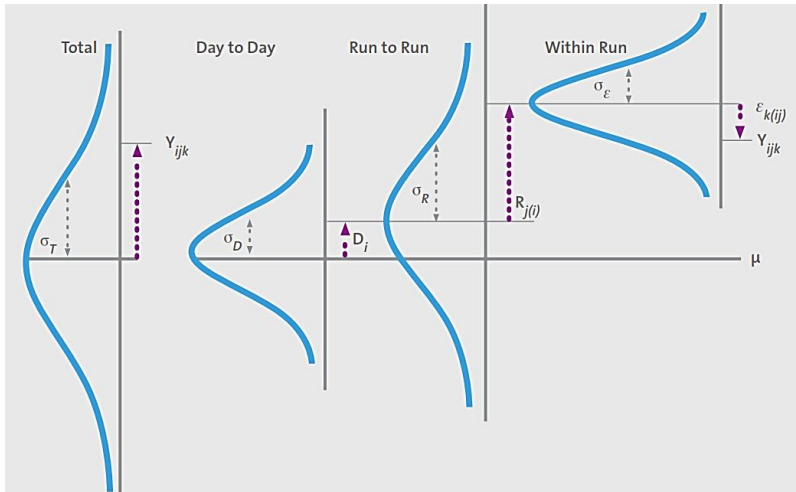


Ilustración 7. Descomposición de la varianza.

Tomado de: (CLSI document EP05-A3, 2014)

2.2.4.3 Veracidad

La veracidad es la medida del error sistémico que expresa el grado de concordancia entre los valores de la media aritmética de un grupo de resultados en relación con un valor considerado de referencia.

Para la evaluación de la veracidad del método de análisis se utiliza:

- **Porcentaje de recuperación:** Es la máxima cantidad de analito recuperado tras la medición con un método analítico. La medición de la veracidad antes llamada exactitud se la puede realizar usando un material de referencia o de no existir el material de referencia certificado se basa en el uso de un blanco analítico al que se le añade una cantidad conocida de analito. La exactitud se expresa en porcentaje de recuperación, el cual indica el porcentaje del valor medio medido en relación al valor teórico (cantidad de analito añadido). (Botella, 2013); (Westgard, 2013a).

$$R(\%) = \frac{\bar{x}}{\mu} \times 100$$

Ecuación 5. Porcentaje de recuperación

- **Ensayo de recuperación:** Estos estudios tienen alta prioridad cuando no hay otro método analítico para efectuar un experimento de comparación. El ensayo de recuperación permite determinar la inexactitud, específicamente el error sistémico proporcional. Este error presenta una magnitud que aumenta conforme aumenta la concentración del analito. La causa principal de este error es la presencia de una sustancia en la matriz de la muestra que reacciona de manera similar al analito, lo que ocasiona una competencia por el reactivo analítico. (Westgard, 2013a).

2.2.4.4 Especificidad analítica

La especificidad analítica es la capacidad de un método analítico para emitir una señal medible debida sólo a la presencia del analito, sin interferencia de otras sustancias.

Para la evaluación de la veracidad del método de análisis se utiliza:

- **Ensayos de interferencia:** Su propósito es estimar la inexactitud, específicamente el error sistémico constante por la falta de especificidad del método, debido a la influencia de materiales que pudieran estar presentes en el espécimen a analizar. Se llama error sistémico constante debido a que una concentración específica del material interferente causará casi siempre una cantidad constante de error, sin importar la concentración del analito. (Westgard, 2013a). Por la complejidad de la matriz es vital demostrar que el método puede medir específicamente solo la señal proveniente del analito de interés sin interferencia de otros componentes presentes de comportamiento similar al analizable. Al máximo de selectividad se le llamada especificidad analítica.

2.3 Marco conceptual

- **Adecuación al propósito:** Es el grado en el que los analitos, matrices, y concentraciones pueden ser utilizados satisfactoriamente en un método, el cual se ajusta a las exigencias estipuladas entre el analista y el cliente. Siendo entonces la adaptación de un método para un fin (Westgard, 2013).
- **Analito:** Es un componente de interés analítico de una muestra. Se refiere a un elemento de entidad tangible a la medida. Ejemplo: Masa de proteína en orina de 24 horas, proteína es el analito. (Westgard, 2013).
- **Blanco:** En condiciones ideales el blanco presenta todos los componentes de la muestra madre excepto el analito. Se usan para evaluar cuanto de la señal que se midió corresponde en realidad al analito y cuanta a otras causas. (Westgard, 2013);(Skoog, West, & Holler, 2015)
- **Calibración:** Proceso de análisis, en el cual se ajusta el instrumento para que establezca una relación entre la concentración de la sustancia que está siendo analizada y la respuesta de medición. (Westgard, 2013). (Skoog et al., 2015)
- **Corrida:** Corresponde al conjunto de muestras que son medidas en forma continua, manteniendo las condiciones experimentales del ensayo. (Westgard, 2013).
- **Diferencia permitida / error permitido:** Corresponde a la dimensión de la desviación analítica (resultante de todas las fuentes de variación), la cual puede ser tolerada por el usuario en un método ya que aún cumple con los requisitos médicos de la prueba. El error permitido para una sola observación presenta límites que están dados por el valor objetivo de la muestra \pm la dimensión analítica permitida. (CLSI document EP06-A., 2003)
- **Efecto de matriz:** “Influencia de una característica de la muestra, distinta del mensurando, en la medición del mensurando. NOTA: La viscosidad, la tensión superficial, la turbidez, la fuerza iónica y el pH son causas comunes de los efectos de la matriz.” (CLSI document EP07-A2, 2005)

- **Error tipo I (α) o falso positivo:** Corresponde al probable error que se comete cuando se **rechaza** falsamente la hipótesis nula, la cual indica que una sustancia no es “detectada” / no “interfiere” por qué está ausente en la muestra / porque no presenta mecanismo de interferencia, siendo esta afirmación verdadera, por lo cual no debería ser rechazada la hipótesis que la representa. (CLSI document EP07-A2, 2005)
- **Error tipo II (β) o falso negativo:** Corresponde al probable error que se comete cuando se **acepta** falsamente la hipótesis nula, la cual indica que una sustancia no es “detectada” / “interferente” por qué está ausente en la muestra / porque no presenta mecanismo de interferencia, cuando en verdad la sustancia si está presente / si presenta interferencias, por lo cual esta afirmación representada por la hipótesis nula no debería ser aceptada. EP17A2; EP07A2
- **Error analítico total:** Mayor error tolerable sin pérdida de significancia clínica. Corresponde a un intervalo que tiene un nivel de confianza del 90 al 95 %.
- **Especificidad analítica:** Corresponde a la capacidad de un método analítico de cuantificar el analito buscado pese a que existan otras sustancias interferentes, las cuales se espera que estén en la muestra. (Westgard, 2013).
- **Grados de libertad/ degrees of freedom (DF):** Los valores de un conjunto de datos que tienen la posibilidad de variar después de haber sido puesta una restricción a los mismos o después que algunas relaciones líneas han sido impuestas sobre ellos. (De La Cruz, 2013)
- **Hipótesis alternativa:** en el ensayo de interferencia corresponde a la hipótesis que debe probarse para aceptar o rechazar la declaración de que una sustancia causa interferencia mayor que un límite especificado. (CLSI document EP07-A2, 2005)
- **Hipotesis nula:** en el ensayo de interferencia corresponde a la hipótesis que se prueba a un nivel de confianza específica y que indica que no hay interferencia.
- **Interferencia:** Una de las principales causas de sesgo presente en la medición de un analito debido al efecto de un componente o característica específica de la muestra. Puede ser por la falta de especificidad del método o por la presencia de un mecanismo de interferencia.

- **Interferente endógeno:** Describe a una sustancia de origen fisiológico que está presente en una muestra (p. ej., bilirrubina o hemoglobina) la cual actúa como interferente en el análisis de otra sustancia. (CLSI document EP07-A2, 2005)
- **Interferente exógeno:** Describe a una sustancia de origen extracorporal (p. ej., un fármaco o sus metabolitos, un conservante de muestra o un contaminante de muestra) que interfiere con el análisis de otra sustancia en la muestra. (CLSI document EP07-A2, 2005)
- **Incertidumbre de medición:** Es un parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores de cantidad atribuidos a un mensurando, en cuyo intervalo se encuentra el valor verdadero. Es un estimador directo de la exactitud de un resultado. (“ISO 9000:2015(es), Sistemas de gestión de la calidad — Fundamentos y vocabulario”, s/f).
- **Intervalo de medición/rango de medición:** Son valores de mensurando (en unidades apropiadas para el mensurando) que pueden ser medidas por un determinado sistema de medición bajo un error instrumental dentro de los límites especificados, en los cuales los errores por no linealidad, imprecisión u otras fuentes se encuentran dentro del límite. Suele ser llamado rango reportable.
- **Magnitud (medible):** Es un rasgo o propiedad de un cuerpo, sustancia o fenómeno, que puede expresarse mediante un número (cuantitativamente) y una referencia (“VIM”, 2012); (Skoog et al., 2015).
- **Mensurando:** Es la cantidad destinada a ser medida. Ejemplo: Masa de proteína en orina de 24 horas; cantidad de sustancia de glucosa en plasma. En ambos casos el mensurando corresponde a masa de. y cantidad de sustancia de.
- **Nivel de confianza:** Corresponde a la probabilidad de que hayamos acertado al decir que dentro del intervalo se encuentra el valor verdadero del parámetro. Mientras que a la probabilidad de fallar en esta afirmación se le denomina **nivel de significancia**. El nivel de confianza corresponde a $(1 - \alpha)$, que es probabilidad asociada con un intervalo de confianza. La probabilidad generalmente se denota como un porcentaje: $100(1 - \alpha) \%$. Generalmente se trabaja con un α de 0.05.

- **Rango lineal/rango reportable/rango analítico/rango de trabajo:** Corresponde al rango en el cual los resultados son lineales debido a que el error no lineal es menor al objetivo de error (CLSI document EP06-A., 2003)
- **Regresión de mínimos cuadrados:** Corresponde al método mediante el cual se ubica estadísticamente la línea o curva que mejor se adapte a la distribución de los datos, de tal manera que la distancia vertical entre cada punto de datos y la línea de regresión sea la mínima (CLSI document EP06-A., 2003).
- **Sensibilidad analítica:** La sensibilidad analítica de un sistema de medición corresponde a la pendiente de la curva de calibración y no es indicador del límite de detección o del límite de cuantificación.
- **Sesgo:** Diferencia (desviación) entre la expectativa de los resultados de la prueba (valor medido) y un valor de referencia aceptado (el valor verdadero de la magnitud de medida); NOTA: El sesgo es una medida de veracidad (CLSI document EP15-A3, 2014).
- **Solución estándar:** Sustancias empleadas con fines de identificación o calibración, en la cual está presente una propiedad particular y por lo tanto puede utilizarse como referencia de medida (Westgard, 2013); (Skoog et al., 2015).
- **Veracidad:** Es una propiedad inherente, que indica la ausencia de un error sistémico. (“ISO 9000:2015(es), Sistemas de gestión de la calidad — Fundamentos y vocabulario”, s/f). Corresponde a la concordancia de un valor promedio en relación con un valor considerado de referencia. Generalmente se expresa en términos de sesgo que esta inversamente relacionado con la veracidad (CLSI document EP06-A., 2003; CLSI document EP07-A2, 2005).

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1 Diseño del estudio

El presente estudio es de tipo observacional, descriptivo y transversal. El investigador no controla las variables (observacional); descriptivo ya que permite recolectar información que demuestre las relaciones de las variables a estudiar y transversal porque solo se realiza una medición de las variables sin seguir una evolución de estas a lo largo del tiempo.

3.2 Población

El material biológico requerido para el estudio preliminar de validación del método se obtuvo de la población de pacientes adultos (*entendidos como sujetos mayores de edad con libre autonomía de decidir por cuenta propia y sin necesidad de terceros*) con antecedentes de cáncer de tiroides tipo papilar sometidos a tiroidectomía total, los cuales acuden al Hospital Oncológico SOLCA, Núcleo-Quito para revisión y seguimiento.

3.3 Muestra, tamaño muestral y selección

3.3.1 Muestra

Las muestras biológicas utilizadas en los ensayos preliminares de validación del método corresponden a las soluciones de lavado de la aguja de punción-aspiración de ganglios cervicales de pacientes con antecedentes de cáncer de tiroides de tipo papilar sometidos a tiroidectomía total que se encuentran en seguimiento en el Hospital Oncológico SOLCA, Núcleo-Quito y que cumplen con los criterios de inclusión establecidos para el estudio.

3.3.2 Tamaño muestral

El número de muestras biológicas que se utilizó en el estudio de validación están definidas en las guías y protocolos CLSI para cada uno de los ensayos. La población total correspondió a 17

muestras biológicas (solución salina utilizada en el lavado de la aguja usada en la punción y aspiración de ganglios) de las cuales 3 muestras fueron positivas para metástasis y provinieron de 2 punciones eco guiadas (ganglio izquierdo y derecho de un paciente y ganglio derecho de otro paciente), 8 muestras de lesiones benignas reactivas (ganglios con hiperplasia reactiva) y 6 muestras negativas para malignidad. El total de la población permitió el desarrollo de cada uno de los ensayos preliminares de validación de acuerdo al tamaño muestral establecido en cada uno de los protocolos del CLSI utilizados para el estudio.

- 30 alícuotas para el desarrollo del ensayo de precisión y sesgo (nivel 1.2 ng/mL) (CLSI document EP15-A3, 2014).
- 30 alícuotas del control comercial de tercera opinión para el ensayo de sesgo (nivel 7 ng/mL) (CLSI document EP15-A3, 2014).
- 32 alícuotas para el ensayo de linealidad. (CLSI document EP06-A., 2003).
- 30 alícuotas para el ensayo de interferencia. (CLSI document & EP07-A2, 2005).

3.3.3 Selección de la muestra

3.3.3.1 Criterios de inclusión

En cuanto al paciente y la patología:

- Pacientes adultos (*entendidos como hombres y mujeres mayores de edad que tenga la autonomía de decidir por cuenta propia y sin necesidad de terceras personas ser parte de este estudio*) con antecedentes de cáncer de tiroides de tipo papilar, cuyos resultados ecográficos referidos por el médico que solicita la punción guiada por ultrasonido evidencian posible metástasis a nivel de ganglios cervicales. Los pacientes concurren a chequeo y seguimiento en el Hospital Oncológico SOLCA. La inclusión al estudio será posible solo si cumplen con la característica de haber sido sometido a una tiroidectomía total de glándula tiroides como parte de su tratamiento.
- Pacientes que acepten libre y voluntariamente participar en el estudio y que hayan firmado el consentimiento informado.
- Pacientes que tenga la plena capacidad del ejercicio de su derecho de autonomía en la decisión y sin necesidad de terceras personas, de ser parte de este estudio.

En cuanto a las muestras:

- Todas aquellas muestras conseguidas del lavado de aguja fina utilizada en la punción y aspirado de ganglios linfáticos cervicales presuntivos de metástasis; obtenidas mediante el lavado con 3 mL de solución salina al 0.9% y recogidas en un tubo primario sin anticoagulante para su almacenamiento, transportadas al laboratorio dentro del lapso de 30 minutos para ser alícuotas y mantenidas en congelación hasta el inicio del procesamiento en el laboratorio.

3.3.3.2 Criterios de exclusión

- Toda muestra obtenida de ganglios cervicales provenientes de pacientes con cualquier otro diagnóstico diferente a cáncer de tiroides de tipo papilar.
- Muestras resultantes de pacientes con tiroidectomía parcial o sin tiroidectomía.
- Pacientes que no hayan firmado el consentimiento informado.

3.4 Operacionalización de las variables

Variables principales: linealidad, precisión, veracidad, especificidad (interferencia).

OBJETIVO GENERAL	Determinar la validez del método de electroquimioluminiscencia (ECLIA) en el equipo Cobas e 601 para la cuantificación de tiroglobulina en solución de lavado de aguja de aspirado de punción ganglionar cervical en pacientes con cáncer de tiroides de tipo papilar del Hospital Oncológico SOLCA, Núcleo-Quito, durante el periodo agosto-septiembre 2018
------------------	--

VARIABLES PRINCIPALES.	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	TIPO DE VARIABLE	DIMENSIONES	INDICADOR	TÉCNICA
Rango lineal	Es el rango en el cual los resultados son lineales (capacidad de obtener una relación matemáticamente verificada en línea recta entre un valor observado y la verdadera concentración del analito presente en la muestra) debido a que el error no lineal es menor al objetivo de error. EP06-A	Cuantitativa	Requisitos de linealidad o error permitido debido a la no linealidad	Objetivo de linealidad \leq 10.4%	Ensayo de laboratorio de acuerdo con la guía EP06-A del CLSI.
			Magnitud de la no linealidad en todos los niveles de concentración	*Regresión polinomial. *Error estándar de la pendiente para el coeficiente no lineal. *Prueba t de los coeficientes no lineales. *Cálculo de la desviación de la linealidad en cada concentración.	
			Contribución realizada por el error aleatorio	Calculo de la diferencia agrupada entre las repeticiones	

Imprecisión	Es un indicador del error aleatorio de un análisis. Indica el grado de concordancia existente entre los valores analíticos de ensayos independientes que se han obtenido en condiciones específicas	Cuantitativa	Determinación de la desviación estándar o CV% en condiciones de repetibilidad	Verificación con las estimaciones del fabricante o UVL (Límite de verificación). Objetivo de calidad para precisión intracorrida $\leq 5.47\%$.	Estimación del análisis de varianza ANOVA una vía. Ensayo de laboratorio de acuerdo a guía EP15-A3 del CLSI.
			Determinación de la desviación estándar o CV% en condiciones de precisión intermedia	Verificación con las estimaciones del fabricante o UVL (Límite de verificación). Objetivo de calidad para precisión intracorrida $\leq 7.23\%$.	
Veracidad (sesgo en base a un material de concentración conocida)	Corresponde a la diferencia entre la media de un conjunto de mediciones y un valor de referencia.	Cuantitativa	Magnitud de la diferencia entre el valor medido y el valor de referencia.	intervalo de verificación asociado a una probabilidad incertidumbre expandida	Ensayo de laboratorio de acuerdo a guía EP15-A3 del CLSI
				criterio de calidad expresado como el 10.4% de la media del material de referencia	

Especificidad (interferencia)	Una de las principales causas de sesgo presente en la medición de un analito debido al efecto de un componente o característica específica de la muestra. Puede ser por la falta de especificidad del método o por la presencia de un mecanismo de interferencia.	Cuantitativa	Resultados de la prueba de diferencias pareadas	La diferencia observada de (media de prueba - media del control) debe ser menor al punto de corte (que indica que hipótesis se acepta) o el límite inferior del intervalo de confianza del 95% debe ser menor al punto de corte. <hr/> Recuperación dentro de $\pm 10\%$ del valor inicial para muestra ≤ 2 ng/mL o de $\pm 25\%$ del valor inicial para muestras > 2 ng/mL).	Ensayo de laboratorio de acuerdo a guía EP07-A2 del CLSI
-------------------------------	---	--------------	---	---	--

3.5 Etapas del proceso de investigación

La presente investigación referente a la validación preliminar de un método se desarrolló en cinco fases; tuvo una duración de 2 meses debido a que la frecuencia de recolección de las muestras biológicas dependía, como se mencionó anteriormente, de la solicitud que realice el médico tratante al considerar necesario realizar la PAAF apoyado por los exámenes de imagen y anamnesis. El cronograma de trabajo se adjunta como (**Anexo 1**).

3.5.1 PRIMERA FASE

Previo a la ejecución de la investigación fue necesario solicitar la evaluación del estudio al Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de SOLCA Núcleo-Quito, el cuál emitió su respuesta definitiva el 18 de junio de 2018 (**Anexo 2**). Posteriormente se realizó los trámites en el Ministerio de Salud Pública, quien emitió su autorización el 19 de Julio de 2018 (**Anexo 3**).

3.5.2 SEGUNDA FASE

Recolección y conservación de muestras biológicas

La recolección de muestras biológicas inició el 23 de julio de 2018. Los individuos de los cuáles se obtuvo las muestras biológicas, correspondieron a los pacientes que acudieron al hospital SOLCA Núcleo-Quito a la cita de seguimiento y control luego de haber recibido tratamiento por cáncer de tiroides de tipo papilar. Su inclusión al estudio fue exclusiva a la característica de haber sido sometidos a una tiroidectomía total de tiroides. Los pacientes que formaron parte de la investigación fueron aquellos que aceptaron libre y voluntariamente participar en el estudio.

En la atención sanitaria habitual, cuando el médico tratante sospecha de la posible aparición de metástasis durante el seguimiento por CPT solicita realizar un examen ecográfico con el objetivo de detectar criterios de malignidad de los nódulos como: hiper-ecogenicidad, cambios quísticos, ecogenicidad heterogénea, calcificación, forma redondeada (relación de diámetro longitudinal / transversal <1.5), vascularización anormal y pérdida de hilio ecogénico, datos que contrarrestan las características correspondiente a un ganglio normal, el cual se manifiesta en la ecografía como sólido, con forma oval alargada, hilio bien reconocible e hipo-ecoico. Al respecto es importante mencionar que las características ecográficas más confiables para

detectar metástasis recurrente en ganglios por carcinoma papilar de tiroides son el contenido quístico, el contenido hiperecoico y la ausencia de hilio, pero no la calcificación o el índice de Solbiati <2 (Jiang et al., 2018). Si los criterios ecográficos son sospechosos, los pacientes son direccionados al laboratorio de citología de SOLCA Núcleo-Quito donde previo a la toma de muestra reciben una explicación por parte del médico anatomopatólogo acerca del procedimiento y la técnica PAAF, sus beneficios y posibles complicaciones. En esta etapa la auxiliar de enfermería le entrega al paciente el consentimiento informado para obtener la firma de autorización de la punción.

Puesto que las citas para las punciones se agendan con anticipación, se conoció de ante mano el número de pacientes diarios que cumplían con los criterios de inclusión a la investigación, es así como la intervención del investigador se dio después de que el paciente autorizó la punción. De inmediato se le informó al paciente que **el líquido resultante del lavado de la aguja fina con la que se aspiró el ganglio de forma rutinaria se desecha** y que la punción que le realizaron es independiente del estudio. Posterior se le planteó la posibilidad de contar con su consentimiento para el uso de esta solución de lavado de la aguja de punción-aspiración en el proyecto de investigación titulado “Validación del método CLIA para cuantificación de tiroglobulina en solución de lavado de aguja utilizada en el aspirado de punción ganglionar cervical en pacientes con cáncer de tiroides papilar del Hospital Oncológico SOLCA, Núcleo-Quito, durante el periodo agosto-septiembre 2018”; se le explicó con detalle cuáles serán los procedimientos, fines del estudio y como se asegurará la confidencialidad de los datos del mismo. Se indicó que la muestra biológica sobrante será eliminada siguiendo la normativa vigente en el laboratorio clínico para la eliminación de residuos biológico, aclarando que **las muestras no serán almacenadas para futuras investigaciones**. Si el paciente estuvo de acuerdo en participar en el estudio de manera libre y voluntaria, se le presentó el consentimiento informado adaptado de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y del Ministerio de Salud Pública del Ecuador (**Anexo 4**), el cual fue leído por el paciente, firmado por el mismo y entregado al investigador. En todo momento se respetó las decisiones de cada participante.

La técnica de punción y aspiración con aguja fina eco dirigida es realizada rutinariamente por la doctora Blanca Rosales, jefe del laboratorio de Citología o por el doctor Iván Araujo, médico anatomopatólogo, además de contar con la presencia de un médico interno que guía la punción con el ecógrafo. Aunque el proceso de extracción de muestras no es un procedimiento que se realizó específicamente para la presente investigación, es importante indicar que en la práctica

asistencial se cumplió con todos los protocolos para precautelar la seguridad de los pacientes de acuerdo con la normativa vigente en la institución para los procedimientos de PAAF.

La técnica para la toma de muestra se realiza habitualmente en base a las guías internacionales y protocolos establecidos en el laboratorio. El laboratorio de citología utiliza para la PAAF una aguja de 1.5 a 2.5 cm de longitud y 0.4 a 0.6 cm de diámetro o calibre 23 que es la más citada en bibliografía (Shin et al., 2015). La técnica consiste en dirigir la aguja hacia la lesión a través del plano de corte del ecógrafo controlando siempre el avance de la aguja con el fin de cambiar su trayectoria en caso de necesidad (**Anexo 5**) (Leenhardt et al., 2013). El material biológico resultante de la punción y aspiración es utilizado para realizar frotis en placas porta objetos para posteriormente realizar los procedimientos habituales de procesamiento y tinción de la muestra, su observación en el microscopio y diagnóstico citológico.

Para la recolección se utilizó un tubo de plástico tapón hemogard, sin anticoagulante; la solución salina al 0.9 % fue alicuotada en volúmenes de 3 mL y refrigerada a una temperatura de 2 a 8 °C con el objetivo de evitar su contaminación (**Anexo 6**), para dispensar el volumen de cada alícuota se utilizó una pipeta certificada (**Anexo 7**), (**Anexo 8**).

Para los fines de esta investigación, la aguja fina utilizada en la punción del ganglio cervical se lavó con 3 mL de solución salina al 0,9% (Grani & Fumarola, 2014) llevando a cabo una triple acción de bombeo de acuerdo a los reportes descritos por Borel et al.,(2008), donde se menciona además que con esta técnica se logra lavar el 97% de Tg fuera de la aguja. El personal encargado de la toma de muestras recibió y firmó un POE con el fin de asegurar el cumplimiento de la técnica de recolección. Una vez obtenida la muestra, esta fue rotulada con un código único de identificación de acuerdo con el ensayo para el cual sería usada la muestra (ejemplo: muestra 1, linealidad, 05/06/2018; 8am); el investigador transportó las muestras al laboratorio clínico de SOLCA Núcleo-Quito a temperatura ambiente en un lapso de 30 minutos. Las muestras se centrifugaron a 3500 rpm x 10 minutos con el fin de evitar interferencia analítica por restos de tejido y hemolisis. Se realizaron alícuotas en volúmenes de 200 ul c/u dentro de un lapso de 30 minutos. Las alícuotas se conservaron respetando los límites de estabilidad de la muestra según la variación de temperatura: 48 horas a 15-25 °C, 72 horas a 2-8 °C, más de un mes a -20 °C. Debido a la poca afluencia de pacientes que cumplieran con los criterios de inclusión al estudio ciertas muestras fueron conservadas a -20°C hasta lograr el “n” necesario para empezar el primer ensayo. Se recopilaron los registros de control de temperatura de las refrigeradoras y

congeladores del laboratorio clínico. Con la intención de estandarizar el proceso de preanálisis, se realizó un diagrama de flujo con sus respectivos registros. (**Anexo 9**).

3.5.3 TERCERA FASE

Recolección de datos en los registros de historias clínicas de los individuos de los cuales se obtuvo las muestras biológicas.

De acuerdo con lo mencionado previamente, el plan de investigación se sometió a aprobación por el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de SOLCA Núcleo-Quito, entidad reconocida por el MSP para este proceso. Una vez aprobada la investigación, el CEISH de SOLCA Núcleo-Quito informó al Departamento de Registro Hospitalario de SOLCA Núcleo - Quito y al Departamento de Estadística su resolución, con lo cual se pudo recabar datos específicos, como fue el número de la historia clínica para la codificación, el antecedente diagnóstico y los resultados de la citología de la punción eco dirigida. En todo momento se respetó la confidencialidad de los datos de los individuos de los cuales se obtuvo las muestras biológicas que fueron utilizadas para el estudio.

3.5.4 CUARTA FASE

Del 6 de abril al 14 de mayo de 2018 se llevó a cabo la fase de familiarización con el método y manejo del equipo Cobas 6000, modular e 601. Las actividades de aprendizaje se detallan en el (**Anexo 10**).

Con el fin de controlar todos los procesos analíticos se creó diagramas de flujo para resumir tareas de rutina necesarias para preparar el analizador Cobas e 601. Se dio prioridad a procesos de calibración y sustitución de kits de Tg. (**Anexo 11**). Durante el proceso de validación preliminar del método se generaron registros de mantenimiento preventivo, conductividad eléctrica, calibración, control de calidad, registro de reactivos y consumibles. (**Anexo 12**)

3.5.5 QUINTA FASE

En esta fase se realizó una revisión bibliográfica de la base de datos CLIA y Variabilidad Biológica. El objetivo fue establecer criterios de calidad que permitan mantener los resultados de desempeño analítico dentro de la utilidad clínica.

3.5.5.1 Criterios de calidad

La visión general para los objetivos de desempeño analítico se deriva de la base de datos de Variabilidad Biológica (nivel de desempeño deseable). La **tabla 2** muestra los objetivos de calidad para precisión, sesgo y error total. En la **Ilustración 8** se puede evidenciar las fórmulas utilizadas en el cálculo de las diferentes especificaciones de calidad.

Tabla 2
Objetivos de calidad para Tiroglobulina

Especificaciones deseables para Tiroglobulina (suero).				Error Total %
Variación Biológica		(I) Precisión	(B) Sesgo	
CV% dentro del sujeto	CV% entre sujetos	(%)	(%)	21.9%
14 %	39%	7 %	10.4%	

Nota:

Tomado de "Desirable Biological Variation Database specifications - Westgard", *sf*)

$$I < 0.5CV_w$$

$$B < 0.25 (CV_w^2 + CV_b^2)^{1/2}$$

$$TE < 1.65I + B \text{ (} \alpha < 0.05 \text{)}$$

$$TE < 2.33I + B \text{ (} \alpha < 0.01 \text{)}.$$

Ilustración 8. *Criterios de calidad deseables para precisión (I), sesgo (B) y error total (TE).*

Tomado de(C. Ricós, V. Alvarez, F. Cava, J. V, 1999)

3.5.6 SEXTA FASE

El plan experimental fue ajustado para considerar ciertas características únicas del método y del analito y considerando información ya disponible en la literatura. De acuerdo con el cronograma de trabajo, el primer ensayo realizado fue la determinación de la linealidad (rango lineal), seguido de experimentos simultáneos de estimación del sesgo y precisión. Finalmente se evaluó la especificidad del método por medio de un ensayo de interferencia. Cada una de las guías utilizadas parten de un protocolo estandarizado por el CLSI. A continuación, se describe la metodología experimental utilizada en los ensayos descritos. La metodología fue adecuada a las condiciones de trabajo experimental.

3.5.6.1 Adaptación de la guía EP06-A CLSI. Ensayo de evaluación de la linealidad de un procedimiento de medición cuantitativa.

1. Alcance

La guía expuesta permite establecer, verificar y demostrar el rango lineal. El enfoque polinomial descrito en la versión aprobada de la guía no tiene el objetivo de identificar las causas de la no linealidad significativa. Se utilizan diluciones elaboradas a partir de muestras madres. El protocolo busca evaluar la linealidad aislada de las condiciones de precisión y veracidad tanto como sea posible. La falta de precisión de ciertos métodos puede ser un obstáculo para la aplicación de la metodología expuesta, razón por la cual el protocolo incluye una verificación de la repetibilidad.

2. Criterio de aceptabilidad

El enfoque expuesto requiere establecer los objetivos de error no lineal, para lo cual se tomó en cuenta lo descrito en la guía EP06-A2:

Las metas de linealidad deben derivarse de los objetivos de sesgo, y deben ser menores o iguales a esos objetivos. Cuando se desconocen las concentraciones de las muestras de prueba, los objetivos de calidad deben ser expresados en porcentaje. (CLSI document EP06-A., 2003)

En consecuencia, el objetivo de linealidad es $\leq 10.4\%$ de acuerdo a lo expuesto en la base de datos de Variabilidad Biológica para el analito Tg. (“Desirable Biological Variation Database specifications - Westgard”, s/f)

3. Objetivo

Representar un proceso estadístico que permita conocer la (s) concentración (es) en las cuales el método carece de linealidad y la magnitud de no linealidad en ese nivel de concentración.

4. Descripción del Enfoque Experimental

Se utiliza el método polinomial propuesto por Kroll et al. Para llevar a cabo la evaluación polinómica se asume que el conjunto de datos no es lineal. Este enfoque es paramétrico, por lo cual se asume que los puntos de datos pueden ser descritos por una ecuación matemática representada por una línea o curva, y que existe una distribución normal del error aleatorio. La interpolación de puntos experimentales no se afecta si la curva de mejor ajuste es o no lineal.

El método consiste en dos partes:

- Se examina si un polinomio no lineal se ajusta mejor a los datos que un polinomio lineal.
- Si el polinomio no lineal se ajusta mejor que el polinomio lineal se evalúa si la diferencia entre el polinomio lineal y el no lineal que mejor se ajusta es $<$ el sesgo permisible para el método (objetivo de error no lineal).

5. Requisitos de tiempo

El analista debe estar familiarizados con el funcionamiento del sistema, debe asegurarse que el equipo este bajo control, calibrado, y que las diluciones sean preparadas correctamente. Los resultados para un solo analito deben ser recabados en un solo día.

6. Condiciones experimentales

Para el desarrollo del experimento de linealidad se tomaron en cuenta las directrices indicadas en la guía EP06-A:

Los desarrolladores de nuevos métodos que buscan establecer rangos lineales (incluidos los fabricantes y laboratorios que modifican los métodos existentes) deben usar 7 a 11 concentraciones en todo el rango de medición previsto. Los experimentos deben usar de 2 a 4 réplicas en cada nivel, dependiendo de la imprecisión esperada. (CLSI documento EP06-A., 2003)

Los esquemas que representan la dilución de muestras con 5 a 11 concentraciones proporcionales se adjunta como (**Anexo 13**). Para el desarrollo de este ensayo se trabajó con 11 concentraciones representativas del rango de medición previsto, las cuales se formaron con 4 muestras (2 muestras del mismo paciente a una concentración alta y 2 muestras del mismo paciente a una concentración baja), no se necesitó conocer las concentraciones de los pools antes de tiempo, pero de ser necesario estas se podían calcular de la formula $Concentración = (v_1 * C_1 + v_2 * C_2) / (v_1 + v_2)$, la matriz de las muestras se eligieron de acuerdo con la disponibilidad de materiales y en base a lo descrito en apartados posteriores referentes a la jerarquía de matrices aceptables para las muestras. Se contó con 6 mL resultantes de dos muestras del mismo paciente con el fin de lograr un volumen suficiente que permita las 2 réplicas en todos los puntos, crear concentraciones intermedias y disponer de un volumen de 250 µL para el pipeteo del equipo

La matriz debía ser similar a las muestras que se utilizarían en el laboratorio. Las muestras no debían presentar interferencias conocidas como son: ictericia, lipemia o hemólisis. “Si no se puede cumplir esta condición, el informe final debe indicar cualquier tratamiento de muestra o tipo de matriz utilizado en la evaluación”(CLSI document EP06-A., 2003). Para el desarrollo del ensayo las muestras fueron sometidas a un pretratamiento de centrifugación a 3500 rpm x 10 minutos, para eliminar restos de tejido y hemolisis.

La jerarquía de matrices aceptables se muestra a manera de lista en orden de su validez.

- Conjunto de muestras de pacientes
- Conjunto de muestras de pacientes diluidas con un diluyente recomendado por el fabricante.

- Conjunto de muestras de pacientes complementadas con el analito de interés. (matriz utilizada en el estudio).
- Uso de un control comercial, material de calibración o linealidad.
- Conjunto de muestras diluidas con solución salina u otro diluyente diferente al recomendado.
- Controles comerciales subdiluidos o sobrediluidos.

La matriz ideal corresponde al conjunto de muestras de un paciente que tiene una concentración de analito (Tg) cercana al límite máximo reportable, diluida con el conjunto de muestras de otro paciente que presenta una concentración de analito (Tg) en el límite inferior esperado o evaluado. Si bien se conoce que el carcinoma papilar de tiroides afecta a ganglios linfáticos cervicales del 3 al 30% después de la cirugía, en la atención sanitaria habitual que se llevó a la par en los meses de estudio solo se obtuvo 3 muestras positivas para metástasis provenientes de dos punciones eco guiadas (ganglio izquierdo y derecho de un paciente y ganglio derecho de otro paciente), 8 muestras de lesiones benignas reactivas (hiperplasia reactiva) y 6 muestras negativas para malignidad. Por esta clara limitación en la toma de muestras la posibilidad de usar la matriz ideal fue descartada y se decidió trabajar con la matriz que correspondía al **conjunto de muestras de pacientes complementadas con el analito de interés**. En este contexto la guía EP06-A menciona en su apartado 4.3.3 que:

El material suplementario que contiene el analito **no necesita ser de alta pureza** si no hay sustancias interferentes. Si hay sustancias interferentes presentes, deben tenerse en cuenta (fuente, pureza y efecto anticipado) en el informe. Si se utiliza una solución concentrada de analito para suplementar el conjunto, diluya lo menos posible el grupo de muestra del paciente (menos del 10%, como guía) y documente el disolvente. (CLSI document EP06-A., 2003)

En este sentido se tomó las recomendaciones de la guía para la determinación de la materia prima del material utilizado para complementar la muestra. Se describe que la naturaleza de los constituyentes del material complementario, sus aditivos y estabilizantes pueden causar un efecto, por lo cual se tuvo como prioridad mantener la proteína de origen humano sobre proteínas de otras especies para garantizar sus propiedades físicas y químicas.

El conjunto de muestras que se utilizó en el estudio correspondió a pacientes con cáncer de tiroides tipo papilar sometidos a tiroidectomía total, cuyos diagnósticos citológicos de la punción de ganglios fueron descritos como lesión benigna hiperplásica o negativo para malignidad, en otras palabras, muestras blanco. El material suplementario con el que se decidió trabajar fue material usado para calibrar el test de Tg (**Anexo 14**) cuya naturaleza corresponde a una matriz de suero equino liofilizado al que se le añadió Tg en dos niveles de concentración (0.15 ng/mL y 180 ng/mL aproximadamente). Es importante mencionar que el tipo de Tg utilizado en los calibradores es una preparación de Tg humana altamente purificada calibrada frente al material de referencia certificado BCR 457, la trazabilidad para el calibrador 1 es 0.254 ng/mL con incertidumbre de 0.011 y una trazabilidad para el calibrador 2 es 170 ng/mL y una incertidumbre de 1.605 ng/mL.

7. Rango analítico de trabajo

Las declaraciones de rendimiento del fabricante fueron consideradas al momento de establecer el rango analítico en el que se iba a trabajar con el fin de tener una estimación de los valores máximo y mínimo validados. En el apartado 4.6 de la guía se indica que:

Si las afirmaciones de rango lineal o rango de medición no son válidas para las concentraciones elegidas, se debe realizar un nuevo análisis con concentraciones más apropiadas; o si se analizan cinco o más concentraciones de analito, los datos del pool terminal (si corresponde) se pueden eliminar y el rango se puede acortar de manera apropiada. (CLSI document EP06-A., 2003)

Esta recomendación se tomó durante el transcurso del ensayo, más no se llevó a la práctica por que el rango lineal era demasiado amplio para nuestros fines (el intervalo descrito por el fabricante corresponde a 0.04-500 ng/mL, definido por el límite de detección y el máximo de la curva máster). Sin embargo, el valor de 0.04 ng/mL fue acogido como el límite inferior de linealidad puesto que la evaluación experimental planteada consistía en la determinación de la linealidad en zonas cercanas a 1.0 ng/mL de acuerdo a la publicación realizada por Moon et al.,(2013) , en la que se menciona que el valor de corte óptimo de FNA-Tg en la cual se puede distinguir los GLC malignos de los GLC benignos fue de 1.0 ng / mL (sensibilidad, 93.2%; especificidad, 95.9%). El rango de trabajo tuvo también en consideración la publicación de Zhao et al., (2017), en la cual se menciona que el punto corte en carcinoma papilar de tiroides

para pacientes sin tiroides corresponde a 9,71 ng/FNA. Valor que coincide con lo expuesto por la American Thyroid Association (ATA) que describe 3 puntos de corte para CDT.

- “Tg alta” “positivos” para valores por encima de 10 ng / FNA.
- “Tg baja” “comparar con los resultados de la citología” para valores que son detectables en un rango de 1-10 ng / FNA.
- “Tg indetectable” “normal” para valores por debajo de 1 ng / FNA.

8. Desarrollo del experimento de linealidad

Las diluciones establecidas para 11 niveles de concentración se describen a continuación.

Tabla 3
Esquema de dilución para 11 niveles

NIVELES	MUESTRAS
1	Solución madre (Low)
2	900 µL de (L) + 100 µL de (H)
3	800 µL de (L) + 200 µL de (H)
4	700 µL de (L) + 300 µL de (H)
5	600 µL de (L) + 400 µL de (H)
6	500 µL de (L) + 500 µL de (H)
7	400 µL de (L) + 600 µL de (H)
8	300 µL de (L) + 700 µL de (H)
9	200 µL de (L) + 800 µL de (H)
10	100 µL de (L) + 900 µL de (H)
11	Solución madre de (High)

Tomado de: (CLSI document EP06-A., 2003)

Los materiales utilizados en la preparación de las soluciones madre se describen en la **Tabla 4**. Los calibradores de 1 mL c/u fueron añadidos en su forma reconstituida a 6000 µL de muestra blanco. El calibrador de 0.150 ng/mL (Low) permitió la formación de la “solución madre de concentración baja”, el calibrador de 180 ng/mL (High) dio lugar a la “solución madre de concentración alta”. Las concentraciones teóricas de estas soluciones se calcularon con la fórmula $Concentración = (v_1 * C_1 + v_2 * C_2) / (v_1 + v_2)$, los resultados fueron: 0.02 ng/mL para la solución de concentración baja y 27 ng/mL para la solución de concentración alta, estas concentraciones fueron consideradas como los límites del rango de trabajo. Las muestras se analizaron en secuencia aleatoria y agrupadas de acuerdo con el nivel (2 réplicas por nivel de concentración fueron procesadas en un solo rack de muestras). Se utilizó cubetas Hitachi de 2.5 mL, cada cubeta contenía 250 µL de muestra.

Tabla 4

Materiales utilizados en la preparación de soluciones madre

MATERIALES	Características
1 calibrador Tg CalSet de concentración baja	Frasco liofilizado que se reconstituyó con 1 mL de agua destilada nivel analítico. Concentración nominal de 0.150 ng/mL. Lote # 276694 . trazabilidad 0.254 ng/mL con incertidumbre de 0.011.
1 calibrador Tg CalSet de concentración alta	Frasco liofilizado que se reconstituyó con 1 mL de agua destilada nivel analítico. Concentración nominal de 181 ng/mL. Lote # 276694 . Trazabilidad 170 ng/mL con incertidumbre de 1.605 ng/mL.
4 muestras	Las muestras provenían de 2 pacientes que fueron sometidos a 2 punciones cada uno (ganglio derecho e izquierdo). Los resultados citológicos diagnósticos de la punción de los ganglios fueron descritos como negativos para metástasis con valores de Tg sérica indetectables (muestras blanco) y resultados < 0.04 ng/mL confirmados en el equipo Cobas e 601.

Elaborado por: (Suasnavas C.)

El equipo Cobas 6000 modular e 601 está configurado para reportar valores a partir de su límite de detección (0.04 ng/mL), razón por la cual se evidenció la censura de datos a concentraciones menores, así el nivel 1 de concentración teórica 0.02 ng/mL fue reportado como < al test < 0.04 ng/mL, por este antecedente que ocasionó la ausencia del valor de concentración del nivel 1, se decidió realizar un segundo ensayo pero con un rango de concentración más estrecho que abarcaba al límite de detección y el valor crítico para la toma de decisiones en pacientes con cáncer papilar de tiroides (1 ng/mL). La solución de concentración baja fue una muestra blanco (solución salina al 0.9 %) resultante del lavado de la aguja utilizada en la punción y aspiración de un ganglio, cuyo resultado citológico fue negativo para metástasis y con un valor teórico <0.04 ng/mL de Tg. El esquema utilizado se describe en la **Tabla 5**.

Tabla 5
Esquema de dilución para 5 niveles

NIVELES	MUESTRAS
1	Solución madre de concentración baja (L)
2	750 µL de (L) + 250 µL de (H)
3	500 µL de (L) + 500 µL de (H)
4	250 µL de (L) + 750 µL de (H)
5	Solución madre de concentración alta (H)

Tomado de: (CLSI document EP06-A., 2003)

9. Evaluación de datos y demostración del rango lineal

Los resultados experimentales fueron evaluados en base al siguiente patrón gradual.

- Se examinaron los datos con el fin de identificar errores.
- Puesto que los errores no fueron evidentes, se realizó una gráfica de los resultados con la variable de respuesta (Y) y con la concentración de la muestra (X).

- La gráfica permitió la observación de las desviaciones de la linealidad y la evaluación de los datos atípicos.
- Con el fin de identificar las diferencias en cada nivel se evaluaron las pendientes del segmento.

En la siguiente etapa se realizó la regresión polinomial para polinomios de primer, segundo y tercer orden con los resultados obtenidos. Se utilizó el programa IBM SPSS Statistics versión 24.

El **anexo 15** describe el diagrama de flujo para la estimación de la linealidad.

3.5.6.2 Adaptación de la guía EP15-A3. Verificación de la precisión y estimación del sesgo

El protocolo permite verificar simultáneamente la precisión de un procedimiento de medición (repetibilidad, precisión dentro del laboratorio) y la veracidad del mismo en relación a un material de concentración conocida, está diseñado para proteger al usuario de fallar más del 5% como resultado del azar. Es aplicable, entre otras situaciones, a aquellas en las que existe un desempeño de precisión pre establecido por el fabricante o resultados de precisión publicados que se desarrollaron utilizando la guía CLSI EP05. Este documento no pretende validar el rendimiento de precisión. Sin embargo, se conoce que previo a un estudio más profundo de precisión es necesaria una verificación inicial con el objetivo de detectar datos estadísticos que evidencien un funcionamiento no esperado del sistema. La evaluación de precisión con un experimento con mayores días, mayores réplicas y mayores variables no puede iniciar hasta que las inquietudes resultantes del estudio preliminar se hayan resuelto. Se describe que el uso del instrumento y los lotes de productos específicos (reactivo, calibrador, reactivos genéricos del sistema, etc.) que se usarán en el estudio de evaluación de precisión deben ser replicados en el estudio preliminar.

La estimación del sesgo se la realiza en base a los resultados del experimento de precisión siempre y cuando el material probado tenga un valor target asignado. La elección del material depende del propósito del usuario para estimar el sesgo.

Siempre que la precisión y la veracidad sean evaluadas como aceptables es posible la estimación del error analítico total.

1. COMPROBACIÓN DE LA PRECISIÓN

1.1 Descripción del enfoque experimental

El método propuesto para la estimación de la imprecisión es el análisis de varianza unidireccional (ANOVA una vía) para cada muestra. El objetivo es dividir la variabilidad total del conjunto de datos para una muestra en niveles dentro del grupo y entre grupos. El factor de agrupación utilizado es “corrida”.

1.2 Criterio de aceptabilidad

Para establecer los objetivos de calidad se tomó en cuenta los valores de precisión expuestos por el fabricante. Los resultados experimentales de precisión deben ser menor o igual a la precisión emitida por el fabricante. Para saber si los criterios expuestos por el Fabricante están dentro del desempeño admitido se usó el criterio CLIA para rendimiento aceptable, el cual menciona que se puede aplicar el ET para definir criterios de calidad:

- La SD intracorrída debe ser $1/4$ (0.25) o menos del ET (21.9%)
5.47 %
- La SD entre corrida deber ser $1/3$ (0.33) o menos del ET (21.9%)
7.23 %

Se menciona que los objetivos de precisión también pueden indicarse como “la imprecisión máxima permitida, SD y / o CV expresados como porcentaje (% CV) en cada concentración de analito que se analizará.”(CLSI document EP15-A3, 2014, p. 10)

1.3 Requisitos de tiempo

El experimento dura cinco días, el trabajo se puede completar en una semana, de ser preciso se pueden adicionar días si se necesita una mayor confiabilidad. No es necesario que los días sean a calendario seguido.

1.4 Desarrollo del experimento de precisión

1.4.1 Muestras

La elección de las muestras se la realizó en base a la recomendación citada en el apartado 2.3.1 de la guía EP15-A3 en el que se menciona:

Son necesarias por lo menos dos muestras para el estudio, preferiblemente muestras de pacientes individuales o materiales de control de calidad comerciales. Las muestras deben tener diferentes concentraciones, preferible aquellas que representan puntos de decisión clínica o límites de referencia, o simplemente caer en regiones normales y anormales. (CLSI document EP15-A3, 2014)

El enfoque anteriormente expuesto y en conjunto con las directrices mencionadas en la guía acerca de la atención que se le debe prestar a la imprecisión esperada en los niveles evaluados por el fabricante asintieron la elección de 2 niveles de concentración, los cuales correspondieron a 1.2 ng/mL y 7 ng/mL.

La elección de muestras con niveles cercanos a los informados por el fabricante permite la identificación de las reclamaciones relevantes. Se debe evitar los niveles extremos pues estos requieren una extrapolación más allá del intervalo abarcado por el fabricante, además de que algunas réplicas podrían proporcionar resultados fuera del intervalo de medición. (CLSI document EP15-A3, 2014).

La concentración de 1.2 ng/mL fue codificada como NIVEL 0, correspondió al valor más cercano al punto de corte para CPT, el desvío estándar esperado e interpolado en los valores de desviación estándar del fabricante fue de 0.035 ng/mL en condiciones de repetibilidad y 0.110 ng/mL en condiciones de precisión intermedia. Para el desarrollo del experimento fueron necesarios 6 mL de muestra obtenidas de 2 punciones (2 pacientes con antecedentes de CPT). Puesto que no se pudo contar con suficientes punciones positivas se decidió trabajar con muestras blanco que provenían de pacientes con cáncer papilar de tiroides (CPT) sometidos a tiroidectomía total con resultados citológicos descritos como negativos para metástasis o como hiperplasia reactiva y valores de Tg sérica indetectables. Para aumentar la potencia del diagnóstico, se decidió medir Tg en el líquido del lavado de la aguja, el valor encontrado para todos los pacientes blanco fue <0.04 ng/mL $<$ test. El pool de muestras blanco fue suplementado con el calibrador Tg Calset de 180 ng/mL (el mismo lote utilizado en el ensayo de linealidad). El calibrador fue reconstituido en ese momento. El esquema de preparación de la solución suplementada se basó en el uso de la ecuación $C1*V1=C2*V2$. Para el proceso de alicuotado la solución madre ajustada a 1.2 ng/mL fue homogenizada 10 veces por inversión, enseguida se realizaron 10 alícuotas de 200 μ L cada una, nuevamente la solución fue homogenizada y otras 10 alícuotas fueron realizadas, este proceso se lo replicó una tercera vez. En total se realizaron 30 alícuotas de 200 μ L cada una, las cuales fueron etiquetadas y congeladas a -20 °C.

El nivel de concentración 7 ng/mL fue un control comercial de tercera opinión (Lyphochek Immunoassay Plus) de la casa comercial Bio-Rad, la asignación del valor de referencia se la

hizo usando la media estimada del grupo de pares (7 ng/mL). El control fue reconstituido con 6 mL de agua destilada de acuerdo a lo descrito por el fabricante, se realizaron 30 alícuotas de 200 µL cada una, detrás de lo cual estas fueron etiquetadas y congeladas a -20°C durante el tiempo de duración del experimento. La elección de este nivel se lo hizo teniendo en cuenta los reportes de Zhao et al., (2017) y las directrices dadas por la American Thyroid Association (ATA) en lo referente a los puntos de decisión para cáncer diferenciado de tiroides (dentro del cual se encuentra el CPT). Se evidenció que las concentraciones disponibles a nivel comercial para el Cobas e 601 no abarcaban la concentración de 10 ng/FNA (punto de corte de acuerdo a ATA) (Haugen et al., 2015), a pesar de lo cual se decidió evaluar un nivel de concentración cercano en lo posible al valor expuesto,

1.4.2 Procesamiento

El experimento de precisión se llevó a cabo durante 5 días calendario. Los dos niveles fueron corridos con 3 días de diferencia. Las corridas se programaron para alternar sesiones en la mañana y la tarde, con la finalidad de obtener resultados más representativos de los turnos y operadores.

Al inicio del estudio se calibró el procedimiento de acuerdo a lo descrito por el fabricante para generar la calibración de lote de reactivo, se utilizó el calibrador Tg II CalSet. Todos los días se midieron los controles de calidad (Preci Control Universal en dos niveles de concentración). Los resultados de calibración y control de calidad fueron recabados durante todo el estudio y se adjunta como anexo. Los datos obtenidos se generaron durante varios ciclos de calibración a razón de que los reactivos del estudio fueron cargados y descargados del rotor de reactivos diariamente durante el periodo experimental (los packs de reactivo utilizados en el estudio no eran los utilizados en el trabajo diario del laboratorio pese a ser del mismo lote). Las calibraciones adicionales se midieron después valores de control de calidad anómalos. La muestra individual y los resultados de control de calidad se revisaron diariamente inmediatamente después de completar cada ejecución. La gráfica de Control de Calidad se adjunta como anexo.

Las muestras fueron descongeladas y llevadas a temperatura ambiente. Para cada muestra se procesó cinco réplicas en una sola corrida analítica, entendida esta como un intervalo de tiempo o de mediciones dentro de los cuales la exactitud y la precisión del sistema son aceptables. Para

monitorear este aspecto, se incluyeron controles extras entre las ejecuciones solo cuando se sabía que el número de test disponibles en un pack de reactivo no sería suficiente para completar el experimento diario y el sistema pasaría a utilizar un nuevo pack de reactivo cargado en el equipo.

1.5 Evaluación de datos y determinación de la imprecisión

1.5.1 Integridad de los datos

El ingreso de datos se llevó a cabo con mucha cautela evitando los errores de tipificación y etiquetado de muestras.

Siempre se monitoreo los valores de control de calidad interno. Se descartó una corrida analítica para el nivel 1.2 ng/mL y 7 ng/mL por valores de control de calidad fuera del intervalo (la corrida se reanudó cuando el problema fue resuelto).

Las réplicas tres del tercer y quinto día de corrida para la concentración 7 ng/mL no pudieron ser procesadas por volumen insuficiente de muestra, a razón de esto el N total fue de 23 y no de 25 (conjunto de datos no equilibrado).

El apartado 2.3.3 de la guía EP15-A3 menciona:

Si los nuevos resultados pueden considerarse parte de la misma “ejecución”, los resultados identificados como faltantes o erróneos pueden repetirse inmediatamente. De lo contrario, programe ejecuciones adicionales según sea necesario para garantizar que se cumplan los requisitos mínimos generales para el conjunto de datos final. Para cada muestra, debe haber resultados de al menos cinco ejecuciones y el número total de resultados individuales menos el número de ejecuciones no debe ser inferior a 18. (CLSI document EP15-A3, 2014)

La descripción de los eventos que impidieron el cumplimiento de un N de 25 tuvo el fin de demostrar que existieron errores que no se relacionaron con el rendimiento real del ensayo. Aunque se trató de disminuir al máximo los valores erróneos siempre se tuvo en cuenta lo expuesto en la guía referente a este aspecto, “no confíe en la presunción o la especulación, y no rechace ni repita resultados simplemente porque parezcan aberrantes” (CLSI document EP15-

A3, 2014)

Posterior a la revisión de la integridad de los datos, cada grupo de muestras fue evaluado para buscar valores discordantes con el uso de gráficas de dispersión.

Para la búsqueda de valores atípicos se aplicó el test de Grubbs (un valor es considerado atípico cuando sobrepasa G SDs de la media muestral) donde:

- La \bar{X} y la SD se basan en todos los resultados de N para la muestra (incluido el valor atípico sospechoso).
- El factor G de Grubbs (que depende de N) proviene de la **Tabla 6**.

Tabla 6
Test de Grubbs para valores atípicos

5 corridas		
N	G	n_0
23	3.087	4.565
24	3.112	4.792
25	3.135	5

Nota

n_0 es el promedio de los resultados de cada corrida; G , corresponde al factor de Grubbs. Los límites de Grubbs se calculan como: Límites de Grubbs= $\bar{X} \pm G * SD$. Si los valores caen dentro del límite calculado, estos no son considerados atípicos. (CLSI document EP15-A3, 2014)

1.5.2 Determinación de la imprecisión por análisis de varianza unidireccional

Se realizó un ANOVA unidireccional con los datos recabados durante los cinco días para los dos niveles de concentración probados. Se utilizó el programa IBM SPSS Statistics versión 24.

1.5.3 Comparación de las estimaciones de imprecisión experimentales con las reclamaciones del fabricante

Como era de esperar, los niveles de concentración elegidos (1.2 ng/mL. 7 ng/mL) no coincidieron con los valores expuestos en el inserto del fabricante, por lo cual fue necesario

interpolarse los datos por medio de una regresión lineal. El objetivo fue conocer la SD de la repetibilidad y precisión intermedia al reemplazar el valor “x” de la ecuación de la recta por los niveles de concentración evaluados. La **Tabla 7** describe los valores del fabricante.

Tabla 7
Reporte de precisión para Tg. Fabricante ROCHE.

Muestra	REPETIBILIDAD			PRECISIÓN INTERMEDIA	
	Media (ng/mL)	SD (ng/mL)	CV %	SD (ng/mL)	CV %
reclamo 1	0,289	0,014	4,8	0,017	5,9
reclamo 2	1,10	0,028	2,5	0,050	4,5
reclamo 3	1,56	0,031	2,0	0,062	4,0
PCU 1	19,5	0,419	2,2	0,896	4,6
PCU 2	61,1	1,20	2,0	2,52	4,1

Tomado de: (Roche Diagnostics, s/f)

El valor que se obtuvo de la regresión lineal para cada nivel de concentración fue considerado como el valor objetivo para SD en condiciones de repetibilidad y de precisión intermedia, este valor fue comparado con los resultados experimentales con la intención de verificar que las estimaciones de imprecisión coincidan con las afirmaciones del fabricante.

En la siguiente etapa fue necesario el cálculo del límite de verificación (UVL) para la reclamación del fabricante. El propósito fue establecer al UVL como el criterio de aceptación de la verificación y no a la afirmación del fabricante en sí. El enfoque para calcular el UVL se basa en:

a) Cálculo de los grados de libertad.

- Determinación de los grados de libertad para repetibilidad (df_R).

Para 1.2 ng/mL

$$df_R = N - K$$

$$df_R = 25 - 5$$

$$df_R = 20$$

Para 7 ng/mL

$$df_R = N - K$$

$$df_R = 23 - 5$$

$$df_R = 18$$

- Determinación de los grados de libertad para precisión intermedia (df_{WL}).
 - Determinación del índice de reclamaciones, p , en el nivel de muestra de prueba

$$p = \sigma_{WL}/\sigma_R$$

Dónde: σ_R desvío estándar para repetibilidad del fabricante; σ_{WL} desvío estándar para precisión intermedia del fabricante.

El valor de p calculado se interpoló en la tabla correspondiente para encontrar los df_{WL} (**Anexo.16**). El valor de p que más se acercó al p de la tabla se consideró como la estimación buscada.

- b) Determinación del factor F para el cálculo del UVL utilizando (df_R) y (df_{WL}). (**Anexo 17**).
- c) Calculo del UVL utilizando el factor F y la desviación estándar de la repetibilidad o de la precisión intermedia reportada por el fabricante para el nivel de concentración evaluado.

$$UVL = F * \sigma_{WL} \text{ ó } \sigma_R$$

El **Anexo 18** describe el diagrama de flujo que resume la estimación de la precisión.

2. ESTIMACIÓN DEL SESGO MEDIANTE LA PRUEBA DE MATERIALES DE CONCENTRACIÓN CONOCIDA

2.1 Descripción del Enfoque Experimental

El método propuesto para la estimación de la veracidad corresponde a un estudio de recuperación. La evaluación del sesgo se da por comparación entre el valor target del material elegido para el experimento y los resultados del procedimiento de medición que se está evaluado. El objetivo es determinar la existencia o no de un sesgo significativo entre la media calculada y la concentración target, eso se logra al calcular un intervalo de verificación en torno a la concentración target, el ancho de este intervalo depende de la incertidumbre ligada al valor target del material de referencia. En consecuencia, existe un sesgo estadísticamente significativo cuando la concentración media del experimento sobrepasa el intervalo de verificación. La evaluación del sesgo estimado frente al objetivo de calidad para sesgo debe ser igualmente evaluada, no es aceptable que el sesgo estimado exceda al sesgo objetivo.

2.2 Criterios de aceptabilidad

Para definir los objetivos de calidad para el sesgo se tomó en cuenta lo descrito en el documento guía, en donde se menciona que los objetivos deben ser expresados como el sesgo máximo permitido en cada concentración de analito que está evaluando. Se deben usar términos absolutos o relativos, es decir, como SD, en unidades de concentración, o como una desviación porcentual, como una concentración absoluta o como un porcentaje de la concentración. (CLSI document EP15-A3, 2014, p. 10). El objetivo de calidad para sesgo de acuerdo al criterio de variabilidad biológica es 10.4 % (aceptabilidad clínica). Objetivo de sesgo estadístico estimado como el 10.4% de la media del material de referencia (aceptabilidad estadística). Se necesitan los dos valores puesto que, si el sesgo observado en este experimento es estadísticamente significativo, aún puede ser clínicamente aceptable.

2.3 Requisitos de tiempo

El experimento dura cinco días, el trabajo se puede completar en una semana, de ser preciso se pueden adicionar días si se necesita una mayor confiabilidad. No es necesario que los días sean a calendario seguido.

2.4 Propósito

Las razones por las cuales se realiza el estudio de recuperación influyen en la elección del material adecuado, a su vez el material elegido para el desarrollo del experimento es el que determina los propósitos del estudio.

El uso del control de calidad de tercera opinión Lyphochek Immunoassay Plus de la casa comercial Bio-Rad determinó que la evaluación de la veracidad se la evalúe en relación a su grupo de pares de QC, valor disponible del programa de intercomparación Unity, el número de laboratorios participantes y otros datos importantes se adjuntan en el inserto del software patentado por la mencionada casa comercial (**Anexo 19**); el resultado de sesgo del procedimiento de medición en base a un estudio de recuperación tiene igual validez que el sesgo estimado en un estudio de comparación de métodos.

2.5 Desarrollo del experimento de estimación del sesgo

El diseño experimental 5 x 5 descrito para la verificación de las afirmaciones de precisión es el utilizado en la estimación del sesgo. Se trabajó con un nivel de concentración: 7 ng/mL (control de tercera opinión de la casa comercial Bio-Rad).

2.5.1 Selección del material de referencia

Sin importar la naturaleza del material elegido para la determinación del sesgo es importante que exista un valor target y una incertidumbre expresable como error estándar del material de referencia (se_{RM}), la misma que puede ser declarada por el fabricante o estimada a partir de otros estadísticos asociados a la asignación de valores.

Existen varias fuentes de materiales que pueden ser usados en la determinación del sesgo. Sin embargo, su calidad dependerá de la calidad de asignación del valor target. Para los casos en los que el material de concentración conocida sirve como suplemento de un grupo de muestras de pacientes libres de analito, su valor target es el asociado a la práctica, sin incertidumbre y con un error estándar de cero. De manera similar, los materiales usados en el control de calidad interno, para los que rara vez se conoce su incertidumbre y se_{RM} . En estos casos el intervalo de verificación es más estrecho y existe una alta probabilidad de que el resultado promedio medido

en el experimento caiga fuera de ese intervalo. Los materiales utilizados en las pruebas de competencia, evaluación externa de la calidad y programas de control de calidad entre laboratorios presentan un valor promedio y desviación estándar resultantes de la participación de un gran número de laboratorios con un procedimiento igual o equivalente al que será usado por el usuario. El se_{RM} puede ser calculado en base a los estadísticos descritos y número de laboratorios. El número óptimo de laboratorios participantes en el grupo de pares debe ser como mínimo 10, deseablemente 20 o más para pensar en un valor target confiable.

2.5.2 Determinación del sesgo.

Para la estimación del sesgo fueron necesarios datos obtenidos en el experimento de precisión. **La tabla 8** resume la información necesaria para el análisis estadístico del ensayo. La información descrita para el grupo de pares se detalla como anexo.

Tabla 8

Información necesaria para el cálculo del sesgo.

ESTIMACIONES A PARTIR DEL GRUPO DE PARES
Nivel 1
$\bar{x} MR = 7 \text{ ng/mL}$
$SD_{RM}^a = 0.459; CV = 6.6 \%$,
de puntos = 2768
laboratorios = 34
ESTIMACIONES OBTENIDAS EN EL ESTUDIO DE PRECISIÓN
Nivel 1
$SD^b_{REPETIBILIDAD} = 0.182 \text{ ng/mL}$
$SD_{PRECISIÓN IN.} = 0.492 \text{ ng/mL}$
Media global (\bar{x}) = 7.21 ng/mL

Nota

^a Desviación estándar del material de referencia obtenido del programa interlaboratorios Unity para el control de calidad de tercera opinión Lyphochek Immunoassay Plus de la casa comercial Bio-Rad

^b Desviación estándar obtenida en la verificación de la precisión por EP 15-A3.

2.5.2.1 En la primera etapa se calculó el error estándar de la media ($se_{\bar{x}}$) con el fin de conocer la dispersión de los valores alrededor de la media. Se utilizó la siguiente ecuación:

$$se_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{1}{nRun} \left[SD \text{ PRECISIÓN IN.}^2 - \left(\frac{nRep - 1}{nRep} \right) SD \text{ REPETIBILIDAD}^2 \right]}$$

Ecuación 6. Cálculo del error estándar de la media

Nota

nRun es el número de corridas en el experimento y *nRep* es el número de réplicas por corrida (Si falta un valor se debe trabajar con el número promedio de resultados por corrida para establecer *nRep*, para 23 datos 4.565).

Los cálculos se los realizó utilizando las estimaciones de repetibilidad y precisión intermedia obtenidas en el estudio de verificación de la precisión con EP 15-A3. Sin embargo, la guía recomienda sustituir los valores experimentales de $SD_{\text{PRECISIÓN IN}}$ y $SD_{\text{REPETIBILIDAD}}$ por la repetibilidad del fabricante (σ_R) y la imprecisión dentro del laboratorio (σ_{WL}) (reclamaciones derivadas de la tabla de precisión en el inserto del procedimiento) si el estudio de verificación indica que el desempeño en el laboratorio es consistente con lo descrito por el fabricante. El estudio del fabricante refleja un estudio más amplio usando CLSI document EP05-A3, (2014).

2.5.2.2 Después de encontrar el error estándar de la media, se calculó el error estándar del material de referencia (se_{RM}) para lo cual se utilizó la siguiente fórmula:

$$se_{RM} = \frac{SD_{RM}}{\sqrt{n \text{ laboratorios}}}$$

Ecuación 7. Error estándar del material de referencia

2.5.2.3 Posteriormente se calculó el error estándar combinado (se_c) de la media y el material de referencia. Se utilizó la siguiente fórmula:

$$se_c = \sqrt{se_{\bar{x}}^2 + se_{RM}^2}$$

Ecuación 8. Error estándar combinado

2.5.2.4 En la siguiente etapa se calculó el “tau” siguiendo la fórmula siguiente:

$$tau = \frac{se_{RM}}{se_{\bar{x}}}$$

Ecuación 9. Cálculo del Tau

El valor obtenido para el tau permitió obtener los grados de libertad combinados (*dfc*) para 34 laboratorios según el nivel de concentración. Se adjunta la tabla utilizada para la estimación de los *dfc*. (**Anexo 20**)

2.5.2.5 Los grados de libertad sirvieron para calcular el valor de t para un $\alpha=0.05$ y 3 muestras de prueba. Se siguió la siguiente fórmula:

$$m = t_{1-\alpha/2 * n_{sam}, v}; \text{ el valor exacto para t se obtuvo en Excel con la función INV.T}$$

2.5.2.6 El intervalo de verificación (VI) se obtuvo de la fórmula:

$$VI = \text{Valor objetivo del material de referencia} \pm (m * se_C).$$

Ecuación 10. Intervalo de verificación

2.5.2.7 Finalmente se determinó si la media global experimental está dentro del intervalo de verificación, ya sea en el intervalo calculado con las estimaciones de precisión experimentales o con los desvíos estándar derivados de la tabla de precisión del fabricante.

2.5.2.8 El sesgo estimado fue calculado como:

$$sesgo = \text{Media global } \bar{x} - \text{valor objetivo del material de referencia.}$$

Ecuación 11. Estimación del Sesgo

2.5.3 Análisis de datos.

Si el intervalo de verificación incluye la media observada para sesgo, el sesgo no es estadísticamente significativo (no se muestra que sea diferente de cero) dentro de las limitaciones del experimento. El cálculo de la incertidumbre expandida (ancho medio del IC

para el sesgo, $t_{0.975, dfC} \times se_C$) debe ser comparado con el objetivo de sesgo. Si la incertidumbre expandida sobrepasa el sesgo, el experimento carece de datos suficientes para detectar un sesgo verdadero. Si la incertidumbre es menor que el criterio de calidad, se deduce que el experimento tuvo suficiente precisión y suficientes réplicas para detectar un sesgo verdadero.

El **Anexo 21** describe el diagrama de flujo que resume el ensayo de estimación del sesgo.

3.5.6.3 Adaptación de la guía EP07-A2. Pruebas de interferencia en química clínica.

1. Alcance

Esta guía permite a los fabricantes (cualquier persona que desarrolla un procedimiento de medición para su uso en el laboratorio) y laboratorios caracterizar el desempeño analítico por medio de la identificación de un efecto de interferencia en los resultados de una prueba llevada a cabo en un procedimiento de medición analítico. El efecto analítico de la interferencia en la recuperación del analito debe ser evaluado en el contexto de su importancia médica, por lo cual se debe definir la concentración clínicamente relevante antes de intentar interpretar los resultados de la prueba de interferencia.

Esta guía busca evaluar solo los posibles interferentes analíticos. No aborda la interferencia pre analítica, entendida esta como cambios en el analito o su concentración por efectos fisiológicos causados por drogas y sus metabolitos.

Con esta guía se busca evaluar el sesgo específico de la muestra (interferencia) como algo propio de esta, mas no como una característica de desempeño del procedimiento de medición. Lo anterior se fundamenta desde el concepto mismo de que la inexactitud (error analítico total) es la suma del sesgo del método, sesgo de la muestra y la imprecisión del procedimiento.

2. Descripción del Enfoque experimental

El enfoque estadístico propuesto para la estimación de la interferencia se basa en la prueba de hipótesis, la hipótesis nula hace referencia a la ausencia de interferencia (el sesgo no supera el criterio de interferencia), la hipótesis alternativa indica que hay interferencia (el sesgo supera el criterio de interferencia).

El experimento se realiza en una corrida analítica pues requiere una replicación (precisión) adecuada para tener la seguridad que la prueba se realiza con la potencia suficiente para detectar la interferencia clínicamente significativa y con un nivel de confianza óptimo que permita identificar la ausencia de un sesgo importante a nivel clínico. El número de réplicas adecuado minimiza la posibilidad de rechazar falsamente la hipótesis nula de no hay

interferencia o de rechazar falsamente la hipótesis alternativa que hay interferencia. El tamaño muestral (réplicas) depende del nivel de confianza (α) con el que se prueba la hipótesis nula y del poder ($1-\beta$) con el que se prueba la hipótesis alternativa.

3. Desarrollo del experimento de interferencia

3.1 Tipos de muestras

El interferente elegido fue evaluado en dos concentraciones de analito, si bien se cita que la evaluación debe ser preferiblemente en puntos de decisión médica, en la práctica se decidió trabajar con niveles cercanos (1.3 ng/mL y 4 ng/mL) los cuales fueron elegidos en base al reporte de recuperación del fabricante en el que se menciona que se espera una recuperación de Tiroglobulina de $\pm 10\%$ del valor inicial para muestras ≤ 2 ng/mL y de $\pm 25\%$ para muestras > 2 ng/mL. La matriz de la muestra correspondió a solución salina obtenida del lavado de la aguja utilizada en la punción y aspiración de ganglios linfáticos enriquecida con el calibrador Tg CalSet. Es importante mencionar que el punto de corte para cáncer papilar de tiroides en la matriz solución salina es de 1.0 ng/mL Moon et al.,(2013).

Debido a que las sustancias interferentes causan un sesgo dependiendo de sus concentraciones en la muestra, la elección de la concentración del interferente simuló el peor de los casos. Tanto en la guía EP07-A2 y en el reporte del fabricante se menciona que una concentración de hemoglobina (hemólisis) < 0.6 g/dl, 0.5 g/dl es la concentración de interferente óptima.

3.2 Protocolo para una prueba de interferencia de diferencias pareadas.

3.2.1 Se determinó los dos niveles de concentración de analito. (1.3 ng/mL y 4 ng/mL).

3.2.2 Se estableció el criterio para la interferencia máxima permisible que debe detectarse en la concentración de prueba del analito (d_{max}), hemólisis < 0.6 g/dl (0.5 g/dl).

3.2.3 Se determinó la cantidad de réplicas (n) necesarias para cada nivel de concentración

de acuerdo a lo descrito en la Sección 7.1.3.4 de la guía. El criterio de recuperación para el estudio de interferencia señalado por el fabricante indica que se espera una recuperación de Tiroglobulina de $\pm 10\%$ del valor inicial para muestras ≤ 2 ng/mL de Tg y de $\pm 25\%$ para muestras > 2 ng/mL de Tg. Claramente se observa que la dirección del sesgo/interferencia (hipótesis alternativa) puede ser positiva o negativa por lo que se sabe que la prueba de hipótesis es de dos colas. La ecuación correspondiente para este supuesto es:

$$n = 2 \left[\frac{(Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta}) s}{d_{max}} \right]^2$$

Ecuación 12. Cálculo del número de réplicas

Donde:

- $z_{1-\alpha/2}$ Percentil de la distribución normal para al nivel de confianza 100 (1- α) % para una prueba de dos caras. El valor correspondiente es 95% ($\alpha=0.05$).
- $z_{1-\beta}$ Percentil de la distribución normal para una potencia del 100 (1- β) %. El valor correspondiente es 95% ($\beta=0.05$).
- s Desviación estándar de la repetibilidad del procedimiento de medición. El valor correspondiente para 1.3 ng/mL es 0.0366 ng/mL y para 4 ng/mL 0.225 mg/mL
- d_{max} grado de interferencia aceptable.

3.2.4 Se preparó un “grupo base” de muestras clínicas de acuerdo a lo descrito en la Sección 7.1.2.1 del CLSI document & EP07-A2, (2005).

No fue posible obtener muestras frescas, por lo cual se dispuso de muestras congeladas a -20°C , las muestras fueron rotuladas como blancos y reflejaron en la medida de lo posible la matriz evaluada (solución de lavado de aguja), estas muestras correspondieron a personas sanas (personas cuyo resultado de la citología indicaron “negativo para metástasis por CPT”). Puesto que la población correspondía a pacientes que fueron sometidos a tiroidectomía total, se consideró como única fuente de Tg, a aquella producida durante una metástasis a nivel de ganglios (debido a que los valores de Tg sérica fueron indetectables) y se procedió a cuantificar Tg en líquido de lavado con el fin de reforzar los hallazgos citológicos y clínicos, los valores de Tg < 0.04 ng/ mL fueron considerados blancos.

3.2.5 Se preparó una “**solución madre 20x del posible interferente**”. Se preparó una solución hemolizada bajo el fundamento de choque osmótico a un nivel de prueba cercano a 500 mg/dl (0.5 g/dl).

Se **recolectó** 5 mL de sangre con heparina. La sangre heparinizada fue transferida a un tubo sin anticoagulante. Posteriormente, se separó el suero del paquete globular por centrifugación a 3500 rpm durante 10 minutos. Para este propósito se usó una centrifuga universal. El plasma fue desechado y reemplazado con 10 mL de solución salina al 0.9 %, el tubo fue invertido lentamente 10 veces y centrifugado durante 10 minutos a 3500 rpm, se desechó la solución salina resultante del lavado y se repitió este proceso 2 veces más. Una vez finalizada la fase de lavado, el paquete globular resultante fue diluido con 2.5 mL de agua destilada calidad inyectable intravenosa (volumen similar al paquete globular), la solución fue mezclada 10 veces por inversión y congelada a -20°C durante 12 horas, al cabo de las cuales se procedió a descongelar la solución llevándola a temperatura ambiente y para luego ser centrifugada a 3500 rpm por 30 minutos con el fin de separar el estroma (simulando la obtención de suero hemolizado después de la centrifugación), el sobrenadante (hemolizado) fue separado en otro tubo. Se determinó la concentración de hemoglobina del hemolizado mediante el uso del contador hematológico Sysmex XN-1000 de Roche Diagnostics. Se describe que el hemolizado es estable no más de una semana a 4°C. La concentración medida para la solución madre del interferente fue de: 15 g/dl de hemoglobina

3.2.6 Para ajustar la solución madre del grupo de base a la concentración de analito de 1.3 ng/mL y 4 ng/mL de tiroglobulina fue necesario enriquecer las muestras base con un calibrador de 181 ng/mL (TgCalSet). Para el ajuste se utilizó la ecuación $C1*V1=C2*V2$. Para comprobar el valor nominal calculado se midió una alícuota de la solución con concentración ajustada a 1.3 ng/mL y 4 ng/mL respectivamente.

Ajuste a 1.3 ng/mL.

$C1 = 181 \text{ ng/mL}$ (concentración del calibrador HIGH)

$V1 = X$

$C2 = 1.3 \text{ ng/mL}$ (punto de decisión clínica)

$V2 = 4 \text{ mL de muestra de lavado de aguja} + X$

$$C1*V1=C2*V2$$

$$181 \text{ ng/mL} * X = 1.3 \text{ ng/mL} (4 \text{ mL} + X)$$

$$181 X = 5.2 + 1.3 X$$

$$181 X - 1.3 X = 5.2$$

$$179.7 X = 5.2$$

$$X = 5.2/179.7$$

$$X = 0.029 \text{ mL} / 29 \mu\text{L}$$

Tomar 29 μL del calibrador HIGH de concentración 181 ng/mL y añadirlo a 3.97 mL (3971 μL) de muestra obtenida del lavado de la aguja utilizada en la punción y el aspirado de ganglios (grupo de base), para obtener una solución final con un volumen de 4 mL y una concentración de 1.3 ng/mL.

Ajuste a 4 ng/mL

$$C1 = 181 \text{ ng/mL} \text{ (concentración del calibrador HIGH)}$$

$$V1 = X$$

$$C2 = 4 \text{ ng/mL}$$

$$V2 = 12 \text{ mL de muestra de lavado de aguja} + X$$

$$C1*V1=C2*V2$$

$$181 \text{ ng/mL} * X = 4 \text{ ng/mL} (12 \text{ mL} + X)$$

$$181 X = 48 + 4 X$$

$$181 X - 4 X = 48$$

$$177 X = 48$$

$$X = 48/177$$

$$X = 0.271 \text{ mL} / 271 \mu\text{L}$$

Tomar 271 μL del calibrador HIGH de concentración 181 ng/mL y añadirlo a 11.729 mL (11 mL + 729 μL) de muestra obtenida del lavado de la aguja utilizada en la punción y el aspirado de ganglios (grupo de base), para obtener una solución final con un volumen de 12 mL y una concentración de 4 ng/mL.

Se menciona que el ajuste de los grupos de prueba debe realizarse con material adecuadamente puro, evitando introducir otras sustancias con el analito. Si bien los calibradores pueden contener conservantes y estabilizantes demostrando efectos de interferencia, se consideró como apto a estos materiales debido a las características emitidas por el fabricante. El nivel de Tg

utilizado en los calibradores es una preparación de Tg humana altamente purificada calibrada frente al material de referencia certificado BCR 457, la trazabilidad para el calibrador 1 es 0.254 ng/mL con incertidumbre de 0.011, la trazabilidad para el calibrador 2 es 170 ng/mL con incertidumbre de 1.605 ng/mL.

3.2.7 Para la preparación del **grupo de prueba** se utilizaron los siguientes cálculos.

$C1 = 15 \text{ g/dl (150 g/L)}$ (Concentración de la solución madre de hemolizado)

$V1 = X$

$C2 = 500 \text{ mg/dl (5 g/L)}$ (Concentración de la solución final)

$V2 = 2 \text{ mL} + X$

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

$$150 \text{ g/L} * X = 5 \text{ g/L} (2 \text{ mL} + X)$$

$$150 X = 10 + 5 X$$

$$150 X - 5 X = 10$$

$$145 X = 10$$

$$X = 10/145$$

$$X = 0.069 \text{ mL} / 69 \mu\text{L}$$

Se pipeteó 69 μL de solución madre de hemolizado a un tubo que contenía 1.931 mL (1 mL + 931 μL) de solución de grupo base ajustado a 1.3 ng/mL. Se mezcló por inversión 10 veces. La concentración de esta dilución fue 500 mg/ dl de hemoglobina con un volumen final de 2 mL (aproximadamente 10 alícuotas de 200 μL c/u.)

Para preparar 3.8 mL del grupo de prueba de 4 ng/mL se siguió el esquema descrito anteriormente. Se pipeteó 131 μL del hemolizado en un tubo que contenía 3670 μL de grupo de base ajusto a 4 ng/mL.

3.2.8 Se preparó el **grupo de control** exactamente como el grupo de prueba, excepto que el interferente de prueba (solución madre de hemolizado) se reemplazó por el mismo volumen de disolvente (agua destilada) utilizado en la preparación de la solución madre de hemolizado. Acogiéndose a la recomendación de la guía se

determinó la concentración de hemoglobina en el grupo control, puesto que el líquido obtenido del lavado con aguja fina resultante de la punción y aspirado de ganglios, suele presentar hemólisis.

3.2.9 Se prepararon 9 alícuotas de la muestra de prueba y 9 alícuotas de la muestra de control en la concentración de 4 ng/mL. Así también 3 alícuotas de la muestra de prueba y 3 alícuotas de la muestra de control en la concentración de 1.3 ng/mL. El número de repeticiones se determinó en el paso 3.2.3.

3.2.10 Para el análisis de las muestras de prueba (P) y control (C) se siguió el siguiente esquema.

C₁P₁C_XC_XC₂P₂C_XC_XC₃P₃...C_XC_XC_nP_n,

Este plan de corrida consideró el posible arrastre de muestra. Los resultados del valor de control adicional (C_x) se descartaron. Es importante mencionar que previo a las mediciones se corrieron materiales de control de calidad.

4. Análisis de datos

4.1 Se calculó la diferencia entre las medias de las muestras de prueba y control (d_{obs}).

$$d_{obs} = Interferencia = \bar{x}_{sc.de\ prueba} - \bar{x}_{sc.de\ control}$$

Ecuación 13. Diferencia Observada entre la muestra de prueba y de control

4.2 Para conocer que hipótesis se debe aceptar se calculó el valor de corte (d_c). Se utilizó la siguiente ecuación, donde n es el tamaño real de la muestra (# de réplicas calculadas). El valor de corte, d_c , se calculó para una prueba de dos colas en base a la siguiente ecuación:

$$d_c = \frac{d_{null} + SZ_{1-\alpha/2}}{\sqrt{n}}$$

Ecuación 14. Punto de corte para rechazar o aceptar la hipótesis nula.

Donde: d_{null} es el valor de la hipótesis nula, generalmente = 0. Este supuesto tiene en cuenta que no existe diferencias entre la media de prueba y la media del control.

4.3 Posteriormente se determinó el intervalo de confianza del 95% para el efecto de interferencia. La ecuación utilizada fue la siguiente.

$$\text{Intervalo C. 95\%} = (\bar{x}_{Sc.de\ prueba} - \bar{x}_{sc.control}) \pm t_{0.975,n-1} S \sqrt{\frac{2}{n}}$$

Ecuación 15. Cálculo del Intervalo de Confianza del 95%.

Donde:

$S \sqrt{\frac{2}{n}}$ es la desviación estándar de la diferencia entre las medias en n pruebas y n muestras de control

n es el tamaño real de la muestra (# de réplicas por muestra)

$t_{0.975, n-1}$ es el valor que corresponde al percentil 97.5 de una distribución con $n-1$ grados de libertad. Lo anterior se obtiene de una tabla t de Student.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 ENSAYO DE LINEALIDAD

4.1.1. Corrida analítica 11 niveles de concentración

La corrida analítica correspondiente al ensayo de linealidad con 11 niveles de concentración y dos réplicas por nivel no presentó resultados con valores atípicos (test de Grubbs). El rango de trabajo abarcado va desde el valor resultante de la dilución dos (1.9 ng/mL) hasta la concentración 28 ng/mL correspondiente a la dilución once. Se observa la pérdida de un dato por censura del software del equipo (censura en valores < 0.04 ng/mL). A simple vista se puede observar una relación equidistante entre cada una de las diluciones (tabla 9).

Tabla 9

Resultados del estudio de linealidad para 11 niveles de concentración.

DILUCIÓN	REPLICADO 1	REPLICADO 2	MEDIA
1	<0.04	<0.04	-
2	1,87	1,94	1,905
3	5,21	5,2	5,205
4	8,09	8,1	8,095
5	10,73	10,9	10,815
6	13,78	13,87	13,825
7	16,77	16,44	16,605
8	19,84	20,08	19,960
9	23,91	24,34	24,125
10	25,33	24,66	24,995
11	27,63	28,47	28,050

Elaborado por: (Suasnavas C.)

El enfoque utilizado busca evaluar la no linealidad por lo cual fundamenta sus respuestas en el método polinomial. En este sentido se obtuvieron resultados de regresión para polinomios de primero, segundo y tercer orden. Los coeficientes de regresión descritos en las ecuaciones están etiquetados como b_i . En el modelo de segundo orden, b_2 es el coeficiente no lineal; en el modelo de tercer orden, b_2 y b_3 son coeficientes no lineales.

De los resultados de la regresión polinomial se obtuvo el error estándar de la pendiente para cada coeficiente SE_i , posteriormente se realizó una prueba t para probar si los coeficientes no lineales eran estadísticamente significativos. Se calculó el número de grados de libertad y se buscó el valor crítico para t (dos lados a $\alpha = 0.05$) en una tabla t. El error estándar de la regresión ($S_{y,x}$) se muestra como medida de ajuste y complementa a lo expuesto en el apartado anterior, así, el valor 0,573 correspondiente al modelo de tercer orden muestra un mejor ajuste en relación al modelo de primer orden y segundo orden. Lo anterior se describe a manera de resumen en la **tabla 10**.

Si alguno de los coeficientes no lineales, b_2 en el modelo de segundo orden, o b_2 y b_3 en el modelo de tercer orden, eran significativos, es decir, ($p < 0.05$) o sobrepasaban el valor de t crítico observado se consideró al conjunto de datos como **no lineales** por este protocolo. Los resultados muestran que el coeficiente no lineal para el modelo de segundo orden no fue estadísticamente significativo porque el valor de $t = -1.27$ no excedió el límite de t crítico (-2,109). El modelo de tercer orden presentó un valor de -1,514 para b_3 , de igual manera este coeficiente no fue estadísticamente significativo porque no excedió el t crítico ($\pm 2,119$). Se tuvo en cuenta solo los coeficientes para los términos **no lineales**. Los resultados individuales de cada modelo (primero, segundo y tercer orden) se detallan en el **anexo 22** en donde se evidencia la ausencia de significancia estadística de los coeficientes no lineales.

Tabla 10
Resumen de los resultados del análisis de regresión

ORDEN	símbolo del coeficiente	valor del coeficiente	SE (error estándar) del coeficiente	t-test	grados de libertad	error estándar de la regresión (S _{y.x}).
primero	b0	-3,717	0,335	-11,107		
primero	b1	2,935	0,047	62,321	18	0,605
segundo	b0	-4,507	0,704	-6,402		
segundo	b1	3,237	0,242	13,351		
segundo	b2/ coeficiente no lineal	-0,023	0,018	-1,27	17	0,595
tercero	b0	-2,525	1,474	-1,712		
tercero	b1	1,998	0,851	2,349		
tercero	b2/ coeficiente no lineal	0,192	0,143	1,341		
tercero	b3/ coeficiente no lineal	-0,011	0,007	-1,514	16	0,573

Elaborado por: (Suasnavas C.)

Si bien el análisis de regresión polinómica demostró la linealidad, se creyó conveniente estimar el grado de la poca no linealidad presente en el ensayo con el fin de conocer el error sistemático que caracteriza la distribución (**Tabla 11**). Se evidencia un predominio de error sistemático proporcional.

Tabla 11
Estimación del grado de no linealidad

Actual	Predictor	Predictor	Diferencia	% Diferencia ^b
Media	1^{er} orden	3^{er} orden	3^{er} -1^{er}	
1,905 (dil 2)	2.152	2.152	0	0
5,205 (dil 3)	5.087	4.902	-0.185	-3,636721054
8,095 (dil 4)	8.021	7.838	-0.183	-2,281511034
10,815 (dil 5)	10.95	10.895	-0.055	-0,502283105
13,825 (dil 6)	13.89	14.007	0.117	0,842332613
16,605 (dil 7)	16.82	17.106	0.286	1,700356718
19,960 (dil 8)	19.75	20.128	0.378	1,913924051
24,125 (dil 9)	22.69	23.007	0.317	1,39709123
24,995 (dil 10)	25.63	25.676	0.046	0,179477175
28,050 (dil 11)	28.56	28.070	-0.49	-1,715686275

Nota

^b es calculado como $Diferencia/Predictor\ primer\ orden * 100\%$

Elaborado por: (Suasnavas C.)

El grado de ajuste evidenciado en el modelo de primero, segundo y tercer orden se demuestra en la **Ilustración 9**. La variable independiente corresponde a los niveles de dilución, la variable dependiente se expresa en ng/mL de Tg-SolPAAF pues representa los resultados por duplicado obtenidos para cada dilución. Las ecuaciones de la regresión se evidencian en el extremo superior izquierdo.

Estudio de linealidad Tg-SolPAAF 10 niveles

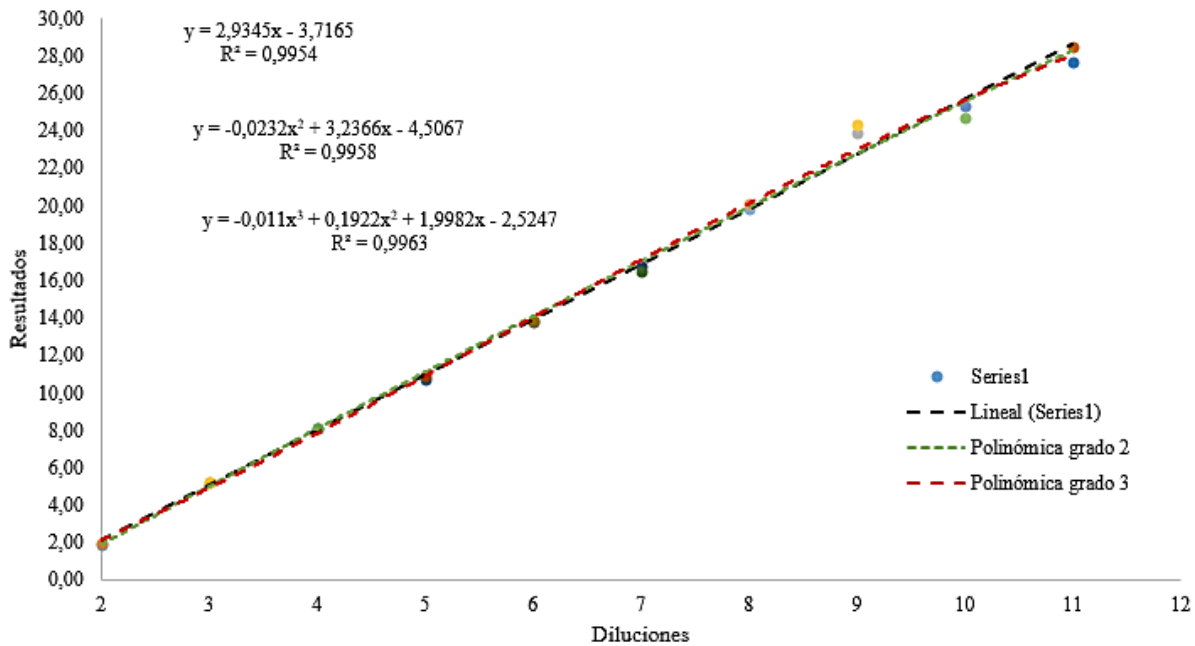


Ilustración 9. Estudio de linealidad para Tiroglobulina Sol-PAAF.

Puesto que hasta el momento solo se consideró la evaluación de la linealidad dejando a un lado la contribución del error aleatorio (la repetibilidad), se debió estimar la diferencia agrupada de las repeticiones.

Los resultados de la evaluación de las diferencias entre las réplicas se muestran en la **Tabla 12**. La suma de las diferencias al cuadrado ($DIFF^2/2$) es 0,77 y el promedio de esa suma es 0,08; la raíz cuadrada de eso es 0,278, que corresponde a la estimación de repetibilidad combinada del pool. Sin embargo, las diferencias entre las réplicas aparentan ser proporcionales en lugar de constantes (se evidencia variaciones muy pequeñas entre las réplicas de los niveles inferiores y variaciones mayores en los niveles superiores), por lo que la diferencia agrupada global (0,278) no es representativa de la realidad por las variaciones proporcionales. En las dos últimas columnas se usan las diferencias expresadas en porcentaje, que calculan una diferencia agrupada de 1,43 % que es lo más óptimo.

Tabla 12

Evaluación de las diferencias de repetibilidad en cada uno de los 11 niveles de concentración.

DILUCIÓN	MEDIA	DIFERENCIA	DIFF²/2	%DIFF	%DIFF²/2
1	-	-	-	-	-
2	1,905	-0,07	0,00	-3,67	6,751
3	5,205	0,01	0,00	0,19	0,018
4	8,095	-0,01	0,00	-0,12	0,008
5	10,815	-0,17	0,01	-1,57	1,235
6	13,825	-0,09	0,00	-0,65	0,212
7	16,605	0,33	0,05	1,99	1,975
8	19,960	-0,24	0,03	-1,20	0,723
9	24,125	-0,43	0,09	-1,78	1,588
10	24,995	0,67	0,22	2,68	3,593
11	28,050	-0,84	0,35	-2,99	4,484
		Sumatoria	0,77	Sumatoria	20,59
		Promedio	0,08	Promedio	2,06
		Repetitividad combinada del pool	0,278	Repetitividad combinada del pool	1,43

Elaborado por: (Suasnavas C.)

4.1.2 Corrida analítica 5 niveles de concentración

La corrida analítica correspondiente al ensayo de linealidad con 5 niveles de concentración y dos réplicas por nivel no presentó resultados con valores atípicos (test de Grubbs). Los límites del rango de trabajo fueron establecidos por la solución nivel uno (<0.04 ng/mL; muestra blanco) y la concentración de la solución nivel 5 (aproximadamente 1.1 ng/mL). (**Tabla 13**)

Tabla 13*Resultados del estudio de linealidad para 5 niveles de concentración.*

DILUCIÓN	REPLICADO 2	REPLICADO 3	MEDIA
1	0,04	0,04	0,04
2	0,263	0,269	0,267
3	0,59	0,568	0,576
4	0,901	0,885	0,884
5	1,14	1,18	1,167

Elaborado por: (Suasnavas C.)

El enfoque utilizado busca evaluar la no linealidad (supone que el conjunto de datos es no lineal) por lo cual fundamenta sus respuestas en el método polinomial. La **Tabla 14** muestra los resultados del análisis de regresión polinómica, se describe el error estándar de la pendiente para cada coeficiente SE_i , el valor de t, los grados de libertad y el error estándar de la regresión..

El análisis del error estándar de la regresión determinó que el valor 0,014 correspondiente al modelo de tercer orden tiene un mejor ajuste en relación al modelo de primer orden y segundo orden.

Por otro lado, se evidenció que el coeficiente no lineal para el modelo de segundo orden no fue estadísticamente significativo porque el valor de $t = 1,195$ no excedió el límite de t crítico (2,365). El modelo de tercer orden presentó un valor de -4,187 para b_3 , este coeficiente fue estadísticamente significativo porque excedió el t crítico ($\pm 2,447$).

La prueba del t crítico y de significancia estadística ($p < 0.05$) detectó no linealidad. En esta etapa no se pudo concluir que esa no linealidad es lo suficientemente grande como para afectar los resultados del paciente. Los resultados individuales de cada modelo polinómico (primero, segundo y tercer orden) se detallan en el **anexo 23**.

Puesto que uno de los coeficientes fue significativo, fue necesario determinar el grado de no linealidad, para lo cual se debió elegir el polinomio en el cual se detectó la no linealidad, que para este caso fue el polinomio de tercer orden, con su coeficiente b_3 (coeficiente no lineal que presentó el mejor ajuste de acuerdo al valor del error estándar de la regresión ($S_{y.x}$)).

Tabla 14
Resumen de los resultados del análisis de regresión 5 diluciones

ORDEN	símbolo del coeficiente	valor del coeficiente	SE (error estándar) del coeficient	t-test	grados de libertad	error estándar de la regresión (S_{y.x}).
primero	b0	-0.273	0.020	-13.64		
primero	b1	0.287	0,006	47.60	8	0,027
segundo	b0	-0.231	0,040	-5.804		
segundo	b1	0.251	0,030	8.280		
segundo	b2/ coeficiente no lineal	0.006	0,005	1.195	7	0,026
tercero	b0	-0.043	0.050	-0.872		
tercero	b1	-0.012	0.065	-0.191		
tercero	b2/ coeficiente no lineal	0.106	0.024	4.406*		
tercero	b3/ coeficiente no lineal	-0.011	0,003	-4.187*	6	0,014

Elaborado por: (Suasnavas C.)

El cálculo de la desviación de la linealidad (DL) en cada nivel de concentración permitió conocer la diferencia entre el modelo no lineal y el modelo lineal con el fin de permitir la comparación con los objetivos predefinidos. El error sistemático evidenciado (% Diferencia) fue mayor en la dilución 1 y 2. Debido a que el rango evaluado fue estrecho, no se pudo determinar si el error sistemático es proporcional o constante (% Diferencia). (Tabla 15)

Tabla 15
Estimación del grado de no linealidad

Actual	Predictor	Predictor	Diferencia	% Diferencia
Media (ng/mL)	1 ^{er} orden	3 ^{er} orden	3 ^{er} -1 ^{er}	
<0,04 (dil. 1)	0,014	0,039	0,025	178.57*
0,267 (dil. 2)	0,300	0,267	-0,033	-11*
0,576 (dil. 3)	0,587	0,574	-0,013	-2,21
0,884 (dil. 4)	0,874	0,892	0,018	2,05
1,167 (dil. 5)	1,161	1,155	-0,006	-0,516

Elaborado por: (Suasnavas C.)

El grado de ajuste evidenciado en el modelo de primero, segundo y tercer orden se demuestra en la **Ilustración 10**. La variable independiente corresponde a los niveles de dilución, la variable dependiente se expresa en ng/mL de Tg-SolPAAF pues representa los resultados por duplicado obtenidos para cada dilución. Las ecuaciones de la regresión se evidencian en el extremo superior izquierdo.

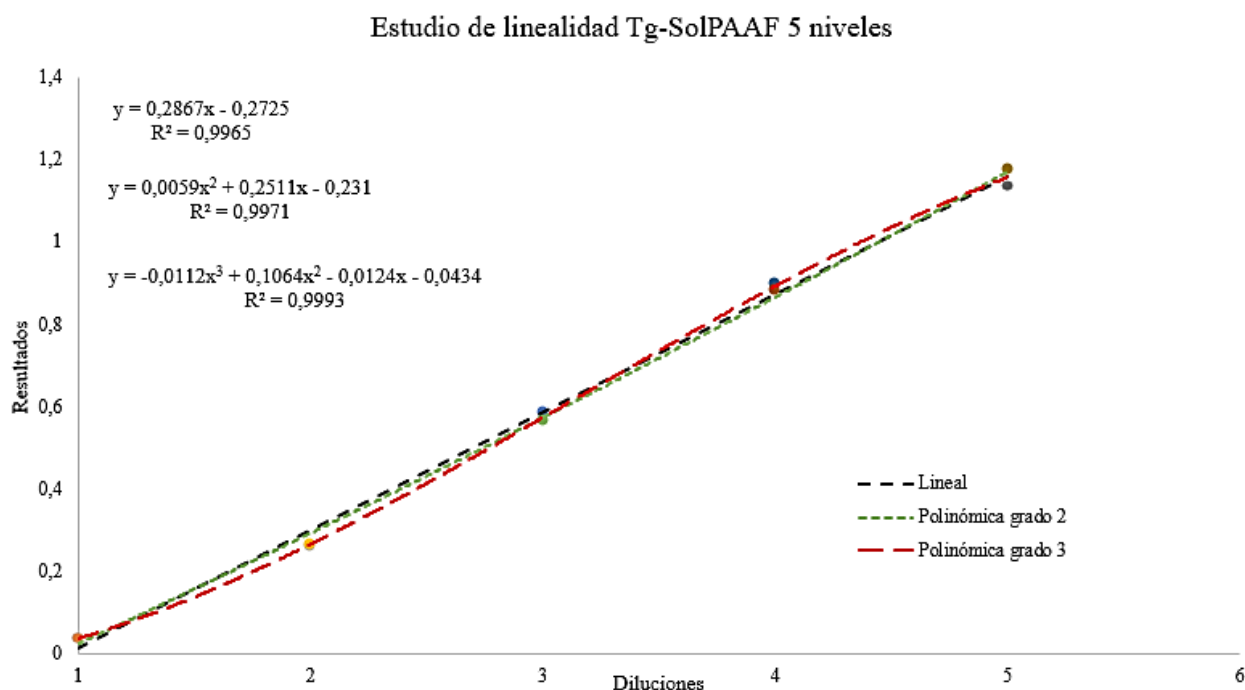


Ilustración 10. Estudio de linealidad para Tiroglobulina Sol-PAAF.

Puesto que hasta el momento solo se consideró la evaluación de la linealidad dejando a un lado la contribución del error aleatorio (la repetibilidad), se debió estimar la diferencia agrupada de las repeticiones.

Los resultados de la evaluación de las diferencias entre las réplicas se muestran en la **Tabla 16**. Se observan variaciones muy pequeñas entre las réplicas de los niveles inferiores. La suma de las diferencias al cuadrado ($DIFF^2/2$) es 0,0012 y el promedio de esa suma es 0,00023; la raíz cuadrada de eso es 0,0154, que corresponde a la estimación de repetibilidad combinada del pool. En las dos últimas columnas se usan las diferencias expresadas en porcentaje, que calculan una diferencia agrupada de 1,86 %.

Tabla 16

Evaluación de las diferencias de repetibilidad en cada uno de los 5 niveles de concentración.

DILUCIÓN	MEDIA	DIFERENCIA	DIFF²/2	%DIFF	%DIFF²/2
1	0,040	0,00	0,00	0,00	0,000
2	0,266	-0,01	0,000018	-2,26	2,544
3	0,579	0,02	0,000242	3,80	7,219
4	0,893	0,02	0,000128	1,79	1,605
5	1,160	-0,04	0,000800	-3,45	5,945
		Sumatoria	0,001188	Sumatoria	17,31
		Promedio	0,000238	Promedio	3,46
		Repetitividad combinada del pool	0,015414	Repetitividad combinada del pool	1,86

Elaborado por: (Suasnavas C.)

4.2 ENSAYO DE PRECISIÓN

4.2.1 Datos

En la **Tabla 17** se evidencian los resultados para el nivel de concentración 1,2 ng/mL. Se identifica los días de corrida y el número de réplicas.

Tabla 17

Diseño experimental 5 X 5. Resultados para el nivel de muestra 1.2 ng/mL

	1	2	3	4	5
Fecha	2-oct.-18	3-oct.-18	4-oct.-18	5-oct.-18	6-oct.-18
Operador	CS	CS	CS	CS	CS
Réplica 1	1,14	1,21	1,37	1,33	1,25
Réplica 2	1,13	1,16	1,40	1,20	1,28
Réplica 3	1,13	1,19	1,45	1,37	1,26
Réplica 4	1,17	1,16	1,44	1,27	1,27
Réplica 5	1,15	1,17	1,42	1,30	1,25

Elaborado por: (Suasnavas C.)

La **Tabla 18** demuestra la ausencia de valores aberrantes debido a que los límites de Grubbs para cada muestra abarcan a todos los valores correspondientes al conjunto de datos por nivel.

Tabla 18

Prueba de Grubbs para el diseño 5x5 a un nivel de muestra 1.2 ng/mL

Prueba Grubb's para Valores Aberrantes				
	Promedio	1,26	DE	0,10 (8.15%) ^a
(N=25)	Min	1,13	Lim Min	0,94
Factor Grubb's 3,135	Max	1,45	Lim Max	1,58

Nota

^a es el valor correspondiente al coeficiente de variación expresado en %

Elaborado por: (Suasnavas C.)

La **Ilustración 11** muestra un diagrama simple del conjunto de datos en el que se puede examinar la consistencia de las distribuciones de una corrida a otra y la consistencia de los valores individuales en relación con el conjunto de datos. El nivel de concentración 1,2 ng/mL es un conjunto de datos equilibrado debido a que todas las corridas presentan el mismo número de réplicas.

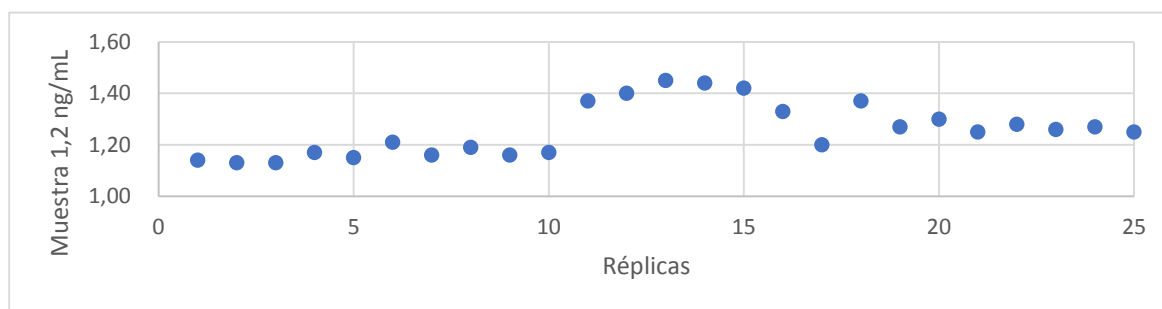


Ilustración 11. Gráfico de dispersión diseño 5 x 5. Nivel 1.2 ng/mL

Elaborado por: (Suasnavas C.)

En la **Tabla 19** se evidencian los resultados para el nivel de concentración 7 ng/mL. Se identifica los días de corrida y el número de réplicas.

Tabla 19

Diseño experimental 5 X 5. Resultados para el nivel de muestra 7 ng/mL

	1	2	3	4	5
Fecha	5-oct.-18	6-oct.-18	7-oct.-18	8-oct.-18	9-oct.-18
Operador	CS	CS	CS	CS	CS
Réplica 1	6,96	6,87	8,09	7,15	6,66
Réplica 2	7,01	7,21	8,28	7,19	6,72
Réplica 3	7,06	7,00	-	7,02	-
Réplica 4	6,99	7,11	8,08	7,04	7,47
Réplica 5	7,04	7,09	7,96	7,12	6,72

Elaborado por: (Suasnavas C.)

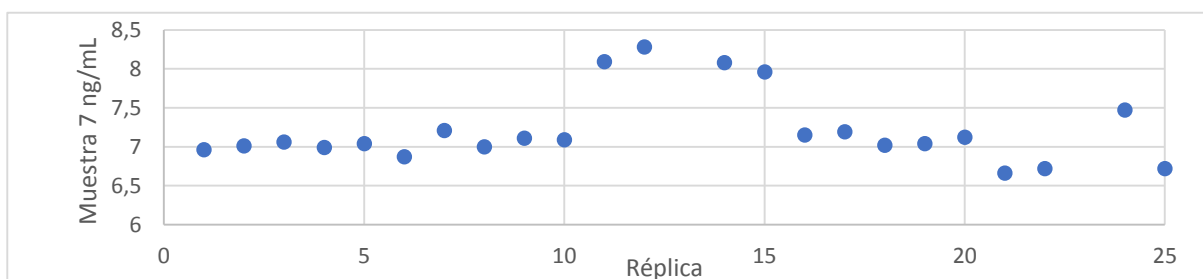
La **Tabla 20** demuestra la ausencia de valores aberrantes debido a que los límites de Grubbs para cada muestra abarcan a todos los valores correspondientes al conjunto de datos por nivel.

Tabla 20*Prueba de Grubbs para el diseño 5x5 a un nivel de muestra 7 ng/mL*

Prueba Grubb's para Valores Aberrantes				
	Promedio	7,21	DE	0,45(6.24%) ^a
N=23;	Min	6,66	Lim Min	5,82
Factor Grubb's	Max	8,28	Lim Max	8,60
3,087				

Nota^a es el valor correspondiente al coeficiente de variación expresado en %**Elaborado por:** (Suasnavas C.)

La **Ilustración 12** muestra un diagrama simple del conjunto de datos en el que se puede examinar la consistencia de las distribuciones de una corrida a otra y la consistencia de los valores individuales en relación con el conjunto de datos. El nivel de concentración 7 ng/mL presenta un conjunto de datos no equilibrados (23 datos) por la pérdida de dos valores en cada nivel de concentración evaluado.

**Ilustración 12.** Gráfico de dispersión diseño 5 x 5. Nivel 7 ng/mL**Elaborado por:** (Suasnavas C.)**4.2.2 Determinación de la imprecisión por análisis de varianza unidireccional**

Los parámetros evidenciados en la tabla de respuesta del ANOVA corresponden a la suma de cuadrados, grados de libertad, media cuadrática, F y significancia para la variación entre grupos y dentro de grupos. El factor de agrupación es “corrida”. Los resultados individuales del ANOVA de una vía para la muestra 1.2 ng/mL y 7 ng/mL se muestran en el **anexo 24**.

La **Tabla 21** resume los cálculos que llevan a las estimaciones de imprecisión para todas las concentraciones muestrales. La media cuadrática entre corrida y dentro de la corrida (*MS1* y *MS2*, respectivamente) provino de los resúmenes generados por el software SPSS para el análisis de ANOVA de una vía. La media de los resultados por corrida, *n₀*, provino de la **Tabla 6**. Los componentes de la varianza entre corrida y dentro de la corrida (Varianza dentro del grupo y Varianza entre grupos) y las estimaciones de repetibilidad e imprecisión dentro del laboratorio (SD para repetibilidad y precisión intermedia) se calcularon a partir de los valores de la tabla ANOVA.

Tabla 21

Resumen de los valores de ANOVA y estimaciones de imprecisión para Tg.

ng/mL	Muestra 1.2	Muestra 7
N	25	23
Media cuadrática entre grupos (<i>MS1</i>).	0.057	0.990
Media cuadrática dentro del grupo (<i>MS2</i>).	0.001	0.033
<i>n₀</i>	5	4.565
Varianza entre grupos	0.011	0.209
Varianza dentro del grupo	0.001	0.033
Media global (\bar{x})	1.26	7.21
SD para repetibilidad ^a (CV%)	0.032 (2.54%)	0.182 (2.53%)
SD para precisión intermedia ^b (CV%)	0.110 (8.73%)	0.492 (6.88%)

Nota

^a y ^b corresponden a la desviación estándar experimental.

Elaborado por: (Suasnavas C.)

4.2.3 Comparación de las estimaciones de imprecisión experimentales con las reclamaciones del fabricante

Como era de esperar, los niveles de concentración experimental 1.2 ng/mL y 7 ng/mL no coincidieron con los niveles de concentración evaluados por el fabricante y expuestos en el inserto. La tabla **22** y la **tabla 23** presentan los valores de SD (desviación estándar) obtenidos por el fabricante en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia. El conjunto de datos

expuestos en el inserto permitió el desarrollo de la regresión lineal. De la regresión lineal se obtuvieron dos ecuaciones, una para valores de repetibilidad (*Ilustración 13*) y otra para valores de precisión intermedia (*Ilustración 14*).

Tabla 22

Valores de SD para repetibilidad. Datos del Fabricante (Inserto).

Y	X
0,014	0,289
0,028	1,10
0,031	1,56
0,42	19,5
1,20	61,1

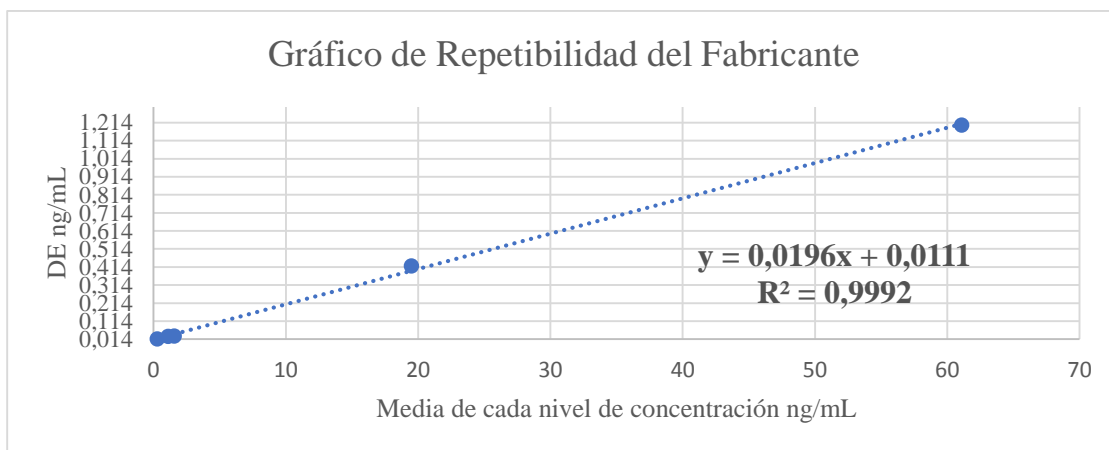


Ilustración 13. Interpolación en los valores de repetibilidad del fabricante.

Elaborado por: (Suasnavas C.)

Tabla 23

Valores de SD para precisión intermedia. Datos del fabricante (Inserto.)

Y	X
0,017	0,289
0,050	1,10
0,062	1,56
0,896	19,5
2,52	61,1

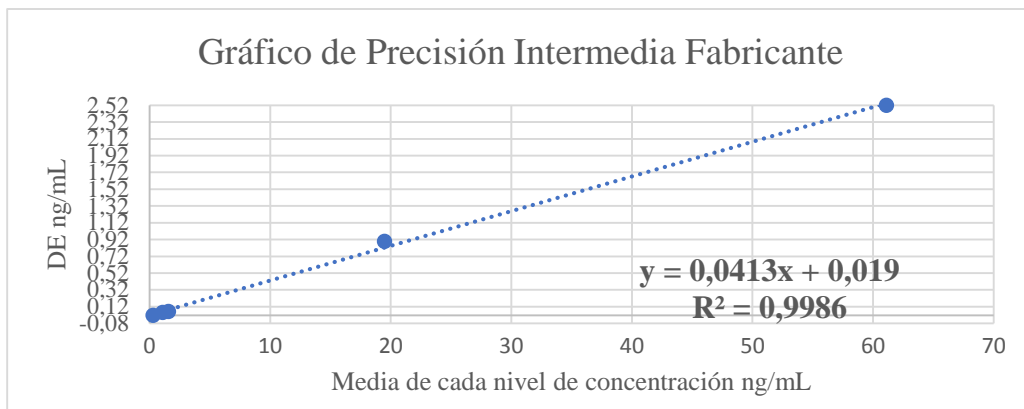


Ilustración 14. Interpolación en los valores de precisión intermedia del fabricante.

Elaborado por: (Suasnavas C.)

El objetivo de la regresión lineal fue conocer la SD estimada, es decir la SD que hubiera obtenido el fabricante si hubiera evaluado los niveles de concentración expuestos en este estudio. Así, el valor del nivel evaluado (1.2 y 7 ng/mL) fue reemplazado en las ecuaciones obtenidas de la regresión lineal.

La comparación de la SD experimental detallada en la tabla 21 fue comparada con el valor de la SD estimada por interpolación de datos (SD objetivos (σ)). La **tabla 24 y 25** describen la comparación de los valores de precisión experimentales con los valores de precisión estimados por el fabricante. Se evidencia que solo la SD experimental de 0.032 ng/mL (nivel de prueba 1.2 ng/mL) presenta una repetibilidad acorde a lo descrito por el fabricante, razón por la cual en el apartado posterior se menciona la necesidad del cálculo del límite de verificación (UVL).

Tabla 24

Comparación de las estimaciones de repetibilidad experimentales y reclamaciones del fabricante

$$y = 0,0196 x + 0,0111$$

Niveles de concentración ng/mL (x)	Desviación estándar (σ_R) fabricante ^a (ng/mL)	Desviación estándar experimental ^b (ng/mL)
1.2	0.035	<u>0.032</u>
7	0.148	0.182

Nota:

^a SD resultante de la interpolación de las concentraciones experimentales.

^b SD calculado a partir de los valores de ANOVA una vía. Se calcula como

$\sqrt{\text{media cuadrática dentro del grupo}(MS2)}$

Elaborado por: (Suasnavas C.)

Tabla 25

Comparación de las estimaciones de precisión intermedia experimental y reclamaciones del fabricante

$$y = 0,0413 x + 0,019$$

Niveles de concentración (x)	Desviación estándar (σ_{WL}) fabricante ^a (ng/mL)	Desviación estándar experimental ^b (ng/mL)
1.2	0.069	0.110
7	0.308	0.492

^a SD resultante de la interpolación de las concentraciones experimentales.

^bSD calculada a partir de los valores de ANOVA una vía como $\sqrt{\text{Var. dentro grupo} + \text{Var. entre grupos}}$;

La Varianza dentro del grupo = Media cuadrática dentro del grupo (MS2);

La Varianza entre grupos = $(MS1 - MS2) / n_0$; MS1 es la Media cuadrática entre grupos; n_0 es el número de resultados "promedio" por corrida.

Elaborado por: (Suasnavas C.)

La estimación del UVL protege al usuario del 5 % de las fallas debidas al azar y establece al UVL como el criterio de aceptación de la verificación y no a la afirmación del fabricante en sí. La **Tabla 26** resume la verificación de la precisión para los niveles de prueba en base a la estimación del UVL.

Tabla 26
UVL como criterio de aceptación de la verificación

	Reclamo 1	Reclamo 2
Concentración (ng/mL)	1.2	7
Repetibilidad		
K	5	5
N	5	4.565
df_R	20	18
F(3 muestras)	1.34	1.35
σ_R ng/ml (CV%)	0.035 (2.92%)	0.148 (2.11%)
UVL_R, ng/mL (CV%)	0.047 (3.91 %)	0.200 (2.86 %)
SD_{REPET. experimental}	0.032 (2,54%)✓	0.182 (2.53%)✓
Precisión Intermedia		
P	1.971	2.081
df_{WL}	6	6
F (3 muestras)	1.61	1.61
σ_{WL} ng/ml (CV%)	0.069 (5.75 %)	0.308 (4.4 %)
UVL_{WL}, ng/mL (CV%)	0.111 (9.25 %)	0.496 (7.09 %)
SD_{PREC. INT experimental (CV%)}	0.110 (8.73%)✓	0.492 (6.88%)✓

Nota

K, total de corridas; **n₀**, es el número de resultados "promedio" por corrida.; **df_R**, grados de libertad para la repetibilidad; **df_{WL}**, grados de libertad para la precisión intermedia; **σ_R**, reclamo de repetibilidad del fabricante; **σ_{WL}**, reclamo de precisión intermedia del fabricante; **UVL_R**, límite superior de verificación para repetibilidad; **UVL_{WL}**, límite superior de verificación para precisión intermedia.

4.3 ENSAYO DE ESTIMACIÓN DEL SESGO MEDIANTE LA PRUEBA DE MATERIALES CON CONCENTRACIONES CONOCIDAS.

Los datos necesarios para el desarrollo de los cálculos para la estimación del sesgo se describen con detalle en la **Tabla 8**.

Teniendo el valor target del material de referencia (dado por la media del grupo de pares) y el valor calculado en el experimento (representado como la media global experimental), se puede calcular la diferencia entre los dos (sesgo). El cálculo del error estándar de esta diferencia, se_c permite la determinación de un intervalo de confianza (alrededor del valor target) que tiene una probabilidad del 0.961 de contener la diferencia (sesgo) real entre los dos valores. El sesgo estimado se evalúa a la luz del intervalo de verificación y del objetivo de sesgo.

Se puede observar que el intervalo de verificación incluye a la media global experimental. El sesgo estimado es estadísticamente significativo (0.21 es diferente de cero) pero clínicamente útil pues el valor de la incertidumbre combinada expandida no excede el sesgo permisible especificado como 10.4 % de la media del grupo de pares (0.728 ng/mL) por lo que se sabe que el ensayo tuvo la suficiente precisión y las suficientes réplicas para detectar un sesgo que exceda el objetivo de calidad.

La **Tabla 27** utiliza los valores de precisión obtenidos en el experimento de verificación de la precisión.

La **Tabla 28** utiliza los valores de precisión (repetibilidad y precisión intermedia) obtenidos por interpolación en los datos expuestos por el fabricante (tabla 24 y 25) debido a que la verificación de la precisión fue consistente con lo descrito por el fabricante. Resulta lógico que al utilizar los valores de precisión interpolados se tenga una mejor estimación del sesgo pues el fabricante utiliza un protocolo más extenso en base a la guía EP05-A3. Por otro lado, esta ventaja puede ser compensada por las incertidumbres que surgen de la necesidad de interpolar en la tabla de fabricante.

Tabla 27*Estimación del Sesgo con valores obtenidos en el estudio de precisión*

ESTIMACIÓN DEL SESGO CON ESTIMACIONES OBTENIDAS EN EL ESTUDIO DE PRECISIÓN ($SD_{PRECISIÓN\ IN}$ y $SD_{REPETIBILIDAD}$)	
Nivel 1	
Concentración target	7 ng/mL
$SD_{REPETIBILIDAD}$	0.182 ng/mL
$SD_{PRECISIÓN\ IN}$	0.492 ng/mL
$se_{\bar{x}}$	0.208 ng/mL
se_{RM}	0.079 ng/mL
se_C	0.222 ng/mL
τ	0.379
Dfc (Anexo 20)	5
probabilidad	0.9916
m	3.526
Intervalo de verificación	6.217-7.783
Media global experimental \bar{x}	7.21 ng/mL
Media material referencia \bar{x}_{MR}	7 ng/mL
Sesgo estimado	0.21 ng/mL
Objetivo de calidad para sesgo	10.4 % de la media del grupo de pares (0.728 ng/mL)
Incertidumbre combinada expandida	0.570

Nota

$se_{\bar{x}}$, se_{RM} , se_C , τ son valores obtenidos de acuerdo a las ecuaciones 6,7,8 y 9. La probabilidad asociada al cálculo del Intervalo de verificación es **0.9916** para dos muestras y dos colas; $SD_{REPETIBILIDAD}$ y $SD_{PRECISIÓN\ IN}$ son los resultados experimentales del ensayo de precisión. Dfc son los grados de libertad combinados. La incertidumbre expandida se calcula como $t_{0.975, Dfc(\text{grados de libertad})} * sec$.

Tabla 28*Estimación del Sesgo con valores de precisión del fabricante*

ESTIMACIÓN DEL SESGO CON σ_R Y σ_{WL} DEL FABRICANTE	
Nivel 1	
Concentración target	7 ng/mL
σ_R	0.148 ng/mL
σ_{WL}	0.308 ng/mL
$se_{\bar{x}}$	0.125 ng/mL
se_{RM}	0.079 ng/mL
se_C	0.145 ng/mL
τ	0.632
dfc	8
<i>probabilidad</i>	0.9916
<i>m</i>	3.0105
Intervalo de verificación	6.564-7.436
Media global exp. \bar{x}	7.21 ng/mL
Media material referencia $\bar{x}MR$	7 ng/mL
Sesgo estimado	0.21 ng/mL
Objetivo de calidad para sesgo	10.4 % de la media del grupo de pares (0.728 ng/mL)
Incertidumbre combinada expandida	0.372

Nota

$se_{\bar{x}}$, se_{RM} , se_C , τ son valores obtenidos de acuerdo a las ecuaciones 6,7,8 y 9. La probabilidad asociada al cálculo del Intervalo de verificación es **0.9916** para dos muestras y dos colas; σ_R y σ_{WL} son los resultados de SD obtenidos por interpolación en los datos reportados por el fabricante (tabla 24 y 25). Dfc son los grados de libertad combinados. La incertidumbre expandida se calcula como $t_{0.975, Dfc}(\text{grados de libertad}) * se_C$.

4.4 ENSAYO DE INTERFERENCIA

Como se nombró en apartados anteriores, el interferente evaluado fue la hemólisis. La solución hemolizada fue preparada bajo el fundamento de choque osmótico. El valor de hemoglobina medido en la solución madre de hemolizado correspondió a 15 g/dl (150g/L), el grupo de prueba de 4 ng/mL tuvo una concentración de la interferente hemoglobina de 0.4 g/dl y el grupo de prueba 1.3 ng/mL tuvo una concentración de 0.5 g/dl, las concentraciones del interferente fueron elegidas en base a la información expuesta por el fabricante.

El enfoque utilizado para la verificación de la interferencia utilizó una prueba de diferencias pareadas. Fue necesaria una replicación adecuada para que la prueba se realice con la potencia suficiente para detectar la interferencia. El número de réplicas analizadas fueron calculadas en base la desviación estándar esperada para el nivel de prueba 4 ng/mL y 1.3 ng/mL. La **ecuación 12** describe lo expuesto.

La **Tabla 29** y la **Tabla 31** describen los resultados obtenidos en las diferentes corridas analíticas. El criterio de recuperación expuesto por el fabricante indica que se espera una recuperación dentro de $\pm 10\%$ del valor inicial para muestra ≤ 2 ng/mL o de $\pm 25\%$ del valor inicial para muestras > 2 ng/mL.

La prueba de diferencias pareadas utiliza la prueba de hipótesis para conocer si existe o no interferencia. La hipótesis nula menciona que no hay interferencia por hemólisis (el sesgo no supera el valor de corte), la hipótesis alternativa establece que si hay interferencia por hemólisis (el sesgo supera el valor de corte). El valor de corte (d_c) y el intervalo de confianza del 95% fueron calculados con el fin de conocer que hipótesis se debe aceptar. Para los dos niveles de prueba la hipótesis aceptada fue la hipótesis nula. Tanto el valor de la diferencia (sesgo) existen entre el nivel de prueba y control, como el valor del límite inferior del intervalo de confianza no superaron el punto de corte. (**Tabla 30, Tabla 32**).

Tabla 29

Resultados de la corrida analítica del nivel "control" y del nivel "prueba" para 4 ng/mL

Grupo control (ng/mL)		Grupo de Prueba (ng/mL)	
C1	3.98	P1	3.99
C2	3.98	P2	3.97
C3	4.01	P3	4.08
C4	4.09	P4	3.93
C5	3.96	P5	3.94
C6	3.93	P6	3.93
C7	3.93	P7	3.91
C8	4.02	P8	3.90
C9	4.01	P9	3.91

Elaborado por: (Suasnavas C.)

Tabla 30

Resultados para el grupo control y el grupo de prueba nivel 4 ng/mL

Grupo control		Grupo de prueba	
Media	X= 3.99 ng/mL	X= 3.95 ng/mL	
Std. Dev.	SD= 0.05 ng/mL	SD= 0.056 ng/mL	
C.V.	CV= 1.25%	CV= 1.43 %	
Diferencia calculada			
(media grupo prueba -media grupo control)			-0.04 ng/mL
Varianza	S ² = 0.0025	S ²	0.0031
Promedio de las varianzas			0.0028
Desviación estándar agrupada			0.053
Intervalo de confianza al 95%			-0.097 a 0.017
Valor de corte (d_c)			0.058

Elaborado por: (Suasnavas C.)

Tabla 31

Resultados de la corrida analítica del nivel "control" y del nivel "prueba" para 1.3 ng/mL

Grupo control (ng/mL)		Grupo de Prueba (ng/mL)	
C1	1.34	P1	1.22
C2	1.37	P2	1.24
C3	1.36	P3	1.23

Elaborado por: (Suasnavas C.)

Tabla 32

Resultados para el grupo control y el grupo de prueba nivel 1.3 ng/mL

Grupo control		Grupo de prueba	
Media	X= 1.357 ng/mL	X=	1.230 ng/mL
Std. Dev.	SD= 0.015 ng/mL	SD=	0.010 ng/mL
C.V.	CV= 1.126 %	CV =	0.813 %
Diferencia calculada (media grupo prueba -media grupo control)			-0.126 ng/mL
Varianza	S ² = 0.00023	S ²	0.0001
Promedio de las varianzas			0.00065
Desviación estándar agrupada			0.012
Intervalo de confianza al 95%			-0.170 a -0.083
Valor de corte (d_c)			0.041

Elaborado por: (Suasnavas C.)

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Todos los resultados estadísticos que se discutirá en párrafos posteriores parten del fundamento de la validación de métodos “buscar y caracterizar errores”.

En el ensayo de linealidad (para 11 niveles de prueba) los desvíos evidenciados en todos los niveles de prueba no parecen ser iguales, por lo que se puede afirmar que la desviación estándar de las réplicas es directamente proporcional a la concentración. Expresar a la repetibilidad combinada en términos de SD 0.278 no fue lo más adecuado si existe una influencia del error sistemático proporcional, por lo cual la expresión en porcentaje (1.43 %) es lo correcto. Ambos valores de repetibilidad combinada son menores al criterio de calidad establecido (5.47% para repetibilidad), por lo que se deduce que la contribución del error aleatorio no es lo suficientemente grande como para causar una no linealidad.

La regresión polinómica fue usada con el objetivo de detectar la no linealidad, por lo que es claro que el análisis de los resultados de los coeficientes no lineales sería tomado en cuenta, en este contexto, todos los coeficientes no lineales fueron no significativos indicando la linealidad y mostrando una visión general de la ausencia de la incompatibilidad de matriz. La ***Tabla 11*** muestra el error sistemático que actúa sobre la linealidad del método, la magnitud de este error es mínima por la ausencia de no linealidad, se observa una tendencia creciente que indica un predominio de error sistemático proporcional sobre el error sistemático constante.

El software del equipo Cobas e 601 presenta censura de datos a valores < 0.04 ng/mL (0.04 es el límite de detección), esta característica fue conocida antes de empezar los estudios planteados en esta investigación; mas, se esperó contar con los valores del fabricante para los coeficientes b y c de la función de Rodbard (con el fin de conocer la concentración en base a las señales de electroquimioluminiscencia); pero, esto no fue posible. Bajo este argumento y en vista de la pérdida del valor correspondiente a la dilución 1 por censura, se decidió realizar un segundo experimento de linealidad, pero tratando de abarcar un rango de trabajo cercano a la región de baja gama del intervalo de medición, esta vez utilizando 5 diluciones.

Nuevamente se cayó en el error de presentar un valor con censura por tener una concentración < 0.04 ng/mL (0.04 es el límite de detección). Sin embargo, este valor no podía ser descartado porque el número de diluciones estaría por debajo del número mínimo requerido para la

aplicación de la regresión polinómica, además de que los valores abarcados en el rango de trabajo eran importantes porque incluía valores que no se abordaron en el primer ensayo (<0.04 ng/mL a 1.16 ng/mL).

Los resultados de regresión polinómica para la corrida analítica con 5 diluciones mostraron significancia estadística para el coeficiente no lineal del modelo cúbico, además el valor del “t” calculado fue mayor que el valor “t” crítico, esta evidencia indicaba la presencia de no linealidad. Conocer que la no linealidad estaba presente no era suficiente; se necesitaba conocer la magnitud de la desviación de la linealidad del ensayo, por lo cual se procedió a evaluar el error sistemático presente. En la **Tabla 15** se evidencia los valores de sesgo para la dilución 1 (< 0.04 ng/mL) y 2 (0.267 ng/mL). Es evidente que estas dos diluciones fueron la causa de la no linealidad en la corrida analítica con 5 diluciones.

Bajo el contexto anterior, se debe recalcar que el fundamento utilizado en la evaluación del error sistemático buscaba la desviación de la linealidad, por lo que era lógico que su estimación se base en el cálculo de la diferencia entre el polinomio que detectó la no linealidad (modelo cúbico para este caso) y el modelo lineal que representaba el mejor de los casos. Si evaluamos el resultado del valor predictor para el modelo lineal en la dilución 1 (entendido este como el resultado del intercepto “y” para la dilución 1 utilizando el modelo lineal) podemos darnos cuenta que de no darse la censura del equipo, el valor de la dilución 1 sería cercano a 0.014 ng/mL; si desglosamos este valor, podemos decir que es una concentración por debajo del límite del blanco descrito por el fabricante (0.02 ng/mL),

Se debe entender que el valor 0.014 ng/mL solo es una estimación del mejor de los casos (que el equipo sea capaz de detectar esta concentración) debido a que la primicia descrita en EP17-A2 indica que si un resultado de medición de muestra está en o por debajo del umbral establecido para el límite del blanco existe una mayor incertidumbre asociada a la detección de ese valor. Lo mencionado podría ser una explicación de una diferencia tan marcada (178.57%) entre el modelo predictor de primer orden y el modelo de tercer orden (que detectó la no linealidad) en la dilución <0.04 ng/mL, además de explicar en parte al valor de sesgo correspondiente a la dilución 2 (11%). Los demás niveles evaluados no mostraron diferencias notables y en consecuencia no excedieron el valor objetivo para la linealidad (sesgo 10.4%).

Dentro del ensayo de linealidad también se evaluó el error aleatorio. Se puede mencionar que

la contribución del error aleatorio fue mínima pues las diferencias de la repetibilidad para cada nivel eran demasiado pequeñas. Resulta interesante mencionar que el error sistemático proporcional también se evidenció en las diferencias de repetibilidad de cada nivel (**Tabla 12**).

El segundo ensayo realizado correspondió a la estimación de la precisión del método. La ejecución de un ensayo de replicación intracorrída (imprecisión o error aleatorio) constituye un ensayo preliminar de validación para obtener una visión general del desempeño del método; de que nos servirá realizar un estudio más profundo y extenso como el planteado en el documento EP05-A3 (20 días, 2 corridas al día y 2 réplicas por corrida) si antes no se han detectado y corregido las causas de error.

El enfoque expuesto en el documento EP15-A3 plantea la evaluación de los resultados experimentales en relación a las reclamaciones de precisión del fabricante. En el ensayo de precisión la matriz utilizada en la conformación del nivel de prueba 1.2 ng/mL fue solución salina (0.9 %) resultante del lavado de la aguja con la que se puncionó ganglios, esta matriz difiere de las validadas por el fabricante y en consecuencia difiere de la muestra utilizada en el estudio de precisión reportado. El nivel de prueba 7 ng/mL correspondió a un control comercial de tercera opinión (Lyphochek Immunoassay Plus). La distribución del conjunto de datos para los niveles evaluados tuvo una variabilidad bastante homogénea y uniforme en el sentido de que las réplicas de cada corrida analítica tenían una dispersión aceptable, en contraste a la mayor variabilidad observada entre corridas. Intuitivamente esto era de esperarse porque las fuentes de variación día a día fueron mayores que dentro del día.

Así, un resultado individual obtenido por el diseño 5 X 5 (planteado en el documento EP15-A3) e independiente del nivel de muestra probado puede modelarse como la media (μ) más las contribuciones de los efectos aleatorios (desviaciones) que son atribuibles a las fuentes de variación diaria y a las fuentes de variación residual (ruido del ensayo). En este sentido el ajuste del modelo de efectos aleatorios, ANOVA UNA VÍA, dio estimaciones para los componentes de la varianza intra corrida y entre corrida con el fin de producir estimaciones de repetibilidad y precisión intermedia para cada muestra del estudio.

Existe una fuente de variación que no se consideró en el diseño, la misma que fue generada por los eventos de calibración (dos eventos de calibración durante los 5 días); ya que, en un estudio pequeño de 5 días y 5 corridas por día, dicha fuente va tener un impacto en mayor grado. Para

la estimación de un tipo de precisión que se ve representada por la combinación de componentes de varianza, la existencia de una fuente contribuyente de variación afecta directamente a los grados de libertad debido a que cada componente de varianza considera sus propios grados de libertad a razón de que la fuente de variación no es homogénea.

Bajo este escenario, considerar la contribución de los grados de libertad por eventos de calibración generaría una menor incertidumbre y en consecuencia una mejor caracterización de la magnitud del tipo de precisión en cuestión. Sin embargo, se debe considerar que el documento EP15 A-3 solo está diseñado para verificar el desempeño de precisión frente a resultados del fabricante, por lo que resulta obvio que el diseño estadístico considerado para este fin no incorpore el análisis de la variabilidad debida a eventos de calibración. Los resultados evidenciados en la práctica para la variabilidad entre días presentan una clara contribución del efecto de las calibraciones, en que grado esta fuente impacta a los resultados, no es conocido. En este sentido se debe indicar que cada evento de calibración introduce un error sistemático diferente que se comportan como un error aleatorio a largo plazo.

Los valores resultantes obtenidos de la comparación de precisión experimental con las afirmaciones del fabricante pueden ser resumidos en el escenario en el cual todos los resultados obtenidos en condiciones de repetibilidad (dentro de la corrida) y precisión intermedia fueron aprobadas y estuvieron cerca o por debajo de los objetivos correspondientes o del UVL, demostrando así que la imprecisión es consistente con las afirmaciones del fabricante.

Los resultados indican que la desviación estándar experimental en condiciones de repetibilidad para el nivel de prueba 1.2 ng/mL fue tan pequeña como 0.032 ng/mL (< 0.035 ng/mL, valor estimado en base a resultados del fabricante); lo que indica que, cada vez que el equipo Cobas e 601 mida una muestra con estas características (matriz y concentración de analito) el error aleatorio relacionado con la repetibilidad del método será mínimo y estará dentro de la calidad requerida. El mismo razonamiento puede ser aplicado para el resultado correspondiente a la precisión intermedia del nivel 1.2 ng/mL, el cual fue de 0.110 (< 0.111 ng/mL, valor del UVL). Para el nivel concentración 7 ng/mL (control tercera opinión) la verificación conforme a lo descrito por el fabricante también es consistente.

Se debe considerar la influencia de varios factores, como son los eventos de calibración, la influencia del error sistemático proporcional (mayor a 7 ng/mL que a 1.2 ng/mL), la influencia

del error aleatorio (mayor a 7 ng/mL que a 1.2 ng/mL) y la contribución de las características intrínsecas de las muestras para establecer conclusiones.

Hasta ahora el análisis de precisión no ha tenido en cuenta el impacto de la desviación estándar en la utilidad de la prueba. Se considera como ejemplo la muestra experimental de nivel 1.2 ng/mL, matriz solución salina, resultados para repetibilidad y precisión intermedia de 0.032 y 0.110 (respectivamente), donde se puede indicar que cada vez que el equipo mida una réplica de una muestra con las características expuestas presentará un rango de variación de ± 0.032 desviaciones estándar alrededor del valor inicial, de igual manera para el valor de precisión intermedia, estos parámetros son importantes desde el punto de vista de la utilidad clínica que se le pretende dar a la prueba (seguimiento de los pacientes). Se debe entender que las desviaciones estándar representan unidades de concentración de analito, por lo que tener una mayor desviación estándar involucra tener una mayor incertidumbre en torno a la verdadera concentración del analito. El punto de decisión clínica expuesto por Moon et al., (2013) estiman el valor de corte para CPT en 1.0 ng/mL de solución de lavado de aguja; con una variación tan pequeña como la evidencia al nivel más cercano (1.2 ng/mL) se puede concluir que este punto de decisión clínica no se ve afectado por la contribución del error aleatorio observado en el equipo Cobas e 601.

En el ensayo de estimación del sesgo, el resultado obtenido indica que, aunque existe un sesgo estadísticamente significativo este es clínicamente útil. En consecuencia, se sabe que un resultado generado por el equipo puede ser comparable con un valor de referencia o un valor discriminante (punto de corte) cercano al nivel evaluado.

Resulta interesante dar a conocer porque el valor obtenido tiene las utilidades descritas anteriormente. En el cálculo de la incertidumbre expandida, cuya fórmula es: $t_{0.975, \text{Grados de libertad (5 Grados de libertad)}} * se_c$, se tiene en cuenta al error estándar acumulado asociado a la diferencia (sesgo) entre el valor medido y el valor del material de referencia (se_c), además se menciona al valor del t crítico calculado para una probabilidad del 97.5 % ($\pm 2,570$), la clara contribución del error aleatorio y del error sistemático en la determinación de la incertidumbre expandida, indica que es válido considerar una aplicación clínica del resultado obtenido.

El valor de incertidumbre calculado corresponde a 0.570 y debido a que no excede el objetivo de sesgo (0.728 ng/mL) se sabe que la utilidad clínica no se pierde. Traducido al laboratorio

clínico, se puede decir que el cambio o la diferencia entre resultados del mismo paciente obtenidos en diferentes ocasiones, tendrá una incertidumbre ± 0.570 del valor inicial, caracterizando así la dispersión de valores que podrían, razonablemente ser atribuidos al mensurando, o que en otras palabras contendrían el valor verdadero.

El sesgo evaluado (0.21 ng/mL) corresponde al nivel 7 ng/mL; teniendo en cuenta que el sesgo del método es directamente proporcional a la concentración, se debe suponer que para el nivel 1 ng/mL existirá un sesgo menor.

Finalmente, se debe considerar que el sesgo obtenido fue estadísticamente significativo en relación al grupo de pares por utilizar como material de concentración conocida un control de calidad de tercera opinión. El resultado de sesgo obtenido en base a la metodología mencionada nos indica que el laboratorio necesita controlar las fuentes de error sistemático para el analito tiroglobulina independientemente de la matriz. Se debe entender que un ensayo de recuperación como el llevado a cabo en este estudio no está diseñado directamente para la evaluación de una interferencia por algún componente de la matriz, solo evalúa el sesgo del método que influye en un resultado. Este aporte es vital pues nos demuestra que los otros ensayos corridos en este estudio preliminar no pierden su valor clínico.

La interferencia o sesgo de la muestra contribuye al error analítico total. Las valoraciones de los procedimientos de medición a menudo solo estiman la imprecisión y el sesgo del método (olvidando la interferencia). El sesgo de la muestra es una dificultad específica de la matriz más que una característica de desempeño del método.

Todas las mediciones de inmunoensayos pueden estar sujetas a interferencias por varios mecanismos que pueden causar un resultado analítico falsamente aumentado o disminuido. Las limitaciones de los inmunoensayos de tiroglobulina sérica presentan interferencias declaradas por el fabricante, por lo que es razonable que se busque verificar los supuestos.

Para la evaluación de las interferencias se analizó en primera instancia que características de la población pueden constituir un interferente analítico y que características constituyen un interferente en la estimación de un punto de corte que favorezca la utilidad clínica en la matriz solución salina de lavado de aguja. Bajo este contexto es importante considerar aspectos clínicos que han sido bien documentados y resultan relevantes en la medición de tiroglobulina

ganglionar.

La tiroglobulina se sintetiza en respuesta a la estimulación del receptor de TSH tanto en las células tiroideas normales, como en las células metastásicas en CDT. Delimitar la población de estudio a pacientes atiroideos permitió tener como indicador de metástasis a la tiroglobulina sérica y a la tiroglobulina ganglionar. En la práctica se evidenció contaminación del aspirado ganglionar con sangre, bajo esta primicia, pensar en la influencia de la tiroglobulina sérica sobre la tiroglobulina ganglionar era obvio. Los reportes de Anne-Laure Borel et al.,(2008) indicaban que la influencia de Tg sérica no era significativa y por lo tanto no afecta la medición de Tg ganglionar. Sin embargo, (Jeon et al., 2015) describían una influencia de la Tiroglobulina sérica en la medición de Tiroglobulina ganglionar en el estado preoperatorio por lo cual proponían diferentes valores de corte para Tg-SolPAAF dependiendo de los niveles de tiroglobulina sérica. Lo anterior descrito reforzó la idea de trabajar con muestras blanco (historia clínica evidencia niveles indetectables de Tg y Ac-anti Tg en sangre, además de un diagnóstico citológico descrito como negativo para metástasis), en las cuales la característica a evaluar era la propia matriz (objetivo del estudio), pues la matriz fue suplementada con concentraciones de tiroglobulina conocidas teóricamente.

Los anticuerpos anti-tiroglobulina interfieren directamente en las mediciones analíticas del mensurando ocasionando valores de tiroglobulina falsamente bajos (algunos ensayos de Tg se afectan más que otros, sea por su sensibilidad o por el número de anticuerpos de captura y señal utilizados). Los anticuerpos anti-Tg están presentes en el suero de pacientes con CDT del 20-30% (Evans, Tennant, & Perros, 2016). Varios estudios realizados en una población con carcinoma papilar de tiroides indican que la medición de Tg ganglionar no se ve influenciada por anticuerpos-anti Tg séricos (Jeon et al., 2013; Konca Degertekin et al., 2016). Otros autores mencionan que los anticuerpos saturan sus puntos de unión a niveles elevados de tiroglobulina, por lo cual, a altas concentraciones de analito no hay una interferencia por autoanticuerpos en la mencionada población (Boi et al., 2006; Martins-Costa et al., 2017; Shin et al., 2015). En contraste, la evidencia encontrada en los estudios de (Jeon et al., 2013) indica una interferencia por anticuerpos a niveles bajos de Tiroglobulina ganglionar. La discrepancia de criterios y teniendo en cuenta que la evaluación de anticuerpos es un gasto económico fuerte, el estudio no consideró la evaluación de los anticuerpos-anti tiroglobulina.

Giovanella et al.(2013) explica que la solución utilizada para lavar el aguja puede ser caracteriza

por su pH, polaridad, partículas sólidas, propiedades fisicoquímicas que podrían inducir interacciones no específicas con los reactivos del kit, si bien este autor da una guía para la validación de la matriz, no expone las condiciones analíticas que permiten el cumplimiento del este fin. Por lo cual el estudio buscó verificar la interferencia en base al documento EP07-A2, utilizando una prueba de diferencias pareadas.

El estudio buscó evaluar un interferente de fácil acceso y que se pueda evidenciar en las muestras obtenidas del lavado de la aguja con la que se realizó la punción eco dirigida. Así, se evaluó el sesgo de la muestra utilizando la interferente hemólisis. Se buscó evaluar indirectamente las propiedades de la matriz (pH, polaridad, partículas sólidas, propiedades fisicoquímicas, restos de tejido resultantes de la punción, etc), pues es razonable considerar que una recuperación aceptable del analito indique que no hubo interferentes de la matriz.

Los valores de sesgo observado para la concentración 1.3 y 4 ng/mL fueron menores al punto de corte (d_c) establecido, por lo que se concluye que el sesgo causado por la hemólisis es menor que la interferencia máxima permisible (hemólisis <0.6 g/dl) en la concentración de prueba del analito. El intervalo de confianza para los dos niveles de prueba siempre abarcó a la diferencia observada experimentalmente (sesgo), el límite inferior del intervalo de confianza del 95% nunca excedió el punto de corte (d_c) reforzando la aceptación de la hipótesis nula.

Se conoce que un sesgo proporcional causará subestimación o sobre estimación de la interferencia en diversos niveles de analito. Este efecto fue considerado y reportado en las estimaciones del fabricante. Al respecto el fabricante menciona directrices para la recuperación. Dentro de $\pm 10\%$ del valor inicial para muestra ≤ 2 ng/mL, el 10% de 1.3 ng/mL (nivel de prueba) fue de ± 0.13 ng/mL, el valor obtenido en la práctica (-0.126 ng/mL) no excedió este criterio. Para muestras mayores a > 2 ng/mL se espera una recuperación de $\pm 25\%$ del valor inicial, el 25% de 4 ng/mL (nivel de prueba) fue ± 1 ng/mL, el valor obtenido experimentalmente (-0.04 ng/mL) no excedió este criterio.

Si analizamos individualmente los estadísticos resultantes de las réplicas para las muestras “control” y “prueba” podemos observar que las desviaciones estándar son similares, indicándonos que el número de réplicas calculado fue el adecuado para tener una confianza y potencia que evite el error tipo I o el error tipo II.

CONCLUSIONES

El rango reportable validado para el método ECLIA en base a la guía EP06-A del CLSI fue de 0.5 ng/mL a 28.05 ng/mL, rango que involucra puntos de decisión clínica para CPT. La ausencia de no linealidad en todo el rango de trabajo y valores para R cercanos a 1 son buenos predictores del estudio, además de que, el error observado no superó el objetivo de error. En consecuencia, se sabe que el equipo Cobas e 601 es capaz de emitir resultados directamente proporcionales a la concentración aun cuando la matriz se haya modificado

La estimación de la precisión del método en base a la guía EP15-A3 del CLSI mostró una desviación estándar (nivel de prueba 1 ng/mL) en condiciones de repetibilidad de 0.032 ng/mL (< 0.035 ng/mL, valor estimado por el fabricante) y 0.110 ng/mL (< 0.111 ng/mL, valor del UVL) en condiciones de precisión intermedia. Con lo cual se deduce que la cuantificación de tiroglobulina en la matriz de lavado de aguja de aspirado ganglionar no presente influencias del error aleatorio.

La estimación de la veracidad del método en base a una prueba de recuperación y utilizando la guía EP15-A3 del CLSI permitió obtener un valor para sesgo de 0.21 ng/mL, el cual fue estadísticamente significativo en relación a un material de referencia, pero clínicamente útil.

La estimación del sesgo de la muestra sobre la base de la guía EP07-A2 del CLSI demostró la ausencia de interferencia por hemólisis y por propiedades de la matriz con resultados de recuperación para Tiroglobulina de acuerdo a lo estimado por el fabricante

Independientemente de la condición del paciente, el equipo Cobas e 601 presenta características de desempeño aceptables que demuestran que el cambio de matriz no afecta a la cuantificación del mensurando Tiroglobulina.

RECOMENDACIONES

Los resultados expuestos son alentadores y abren la posibilidad de evaluaciones más profundas que permitan caracterizar con más potencia el error aleatorio, el error sistemático y el error total relacionados con la medición de tiroglobulina ganglionar, por lo que se recomienda en futuras investigaciones realizar experimentos de precisión total considerando diversas fuentes de variación (calibración, operador), de comparación de métodos (estimación de la veracidad).

La implementación de un plan operativo estandarizado mostró resultados favorecedores en las diferentes etapas del estudio, por lo que se recomienda aplicar en la práctica diaria del laboratorio los diagramas de flujo expuestos como anexos.

Antes de iniciar un proceso de validación se recomienda realiza una revisión exhaustiva de las guías a utilizar con el fin de conocer la información que se solicitará al fabricante. El tiempo de respuesta del fabricante no es inmediato, por lo que cualquier inquietud debe ser generada lo antes posible.

La validación de métodos es un tema sensible y poco entendido por los laboratoristas. La capacitación del personal permitirá que el operador cuestione sus prácticas de control de calidad en las etapas de análisis y preanálisis.

Se recomienda que, en estudios futuros, se determine el valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y se valoren curvas ROC con el fin de estimar la utilidad diagnóstica de la prueba.

BIBLIOGRAFÍA

- Boi, F., Baghino, G., Atzeni, F., Lai, M. L., Faa, G., & Mariotti, S. (2006). The diagnostic value for differentiated thyroid carcinoma metastases of thyroglobulin (Tg) measurement in washout fluid from fine-needle aspiration biopsy of neck lymph nodes is maintained in the presence of circulating anti-Tg antibodies. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *91*(4), 1364–1369. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-1705>
- Boot, C. S., Mahon, B. S., Bramhall, S. R., & Clark, P. M. (2010). Validity of Carcinoembryonic Antigen and Carbohydrate Antigen 19-9 Measurements in Pancreatic Cyst Fluid with a Serum-Based Immunoassay. *Clinical Chemistry*, *56*(8), 1351–1352. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.146373>
- Borel, A.-L., Boizel, R., Faure, P., Barbe, G., Boutonnat, J., Sturm, N., ... Chabre, O. (2008). Significance of low levels of thyroglobulin in fine needle aspirates from cervical lymph nodes of patients with a history of differentiated thyroid cancer. *European Journal of Endocrinology*, *158*(5), 691–698. <https://doi.org/10.1530/EJE-07-0749>
- Botella, P. (2013). Apuntes de Estadística en Ciencias de la Salud. Universidad Cardenal Herrera. Recuperado de <https://www.uv.es/~mamtnez/AECS.pdf>
- C. Ricós, V. Alvarez, F. Cava, J. V. (1999). Current databases on biological variation: pros, cons and progress. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, *59*(7), 491–500. <https://doi.org/10.1080/00365519950185229>
- Camaró, M. L., Martínez, R., Olmos, P., Catalá, V., Ocete, M. D., & Gimeno, C. (2015). Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *33*(7), e31–e36. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.11.010>
- CLSI document EP05-A3. (2014). Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline- Third Edition, *34*(13).
- CLSI document EP06-A. (2003). Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline, *23*(16).
- CLSI document, & EP07-A2. (2005). Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline- Second Edition, *25*(27).

CLSI document EP15-A3. (2014). User Verification of Precision and Estimation of Bias; Approved Guideline—Third Edition, 34(12).

De La Cruz. (2013). Grados de Libertad, 17, 1–6.

Desirable Biological Variation Database specifications - Westgard. (s/f). Recuperado el 20 de noviembre de 2018, de <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>

Evans, C., Tennant, S., & Perros, P. (2016). Serum thyroglobulin in the monitoring of differentiated thyroid cancer. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 76(sup245), S119–S123. <https://doi.org/10.1080/00365513.2016.1210339>

Feldkamp, J., Führer, D., Luster, M., Musholt, T. J., Spitzweg, C., & Schott, M. (2016). Fine Needle Aspiration in the Investigation of Thyroid Nodules. *Deutsches Ärzteblatt International*, 113(20), 353–359. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2016.0353>

Garagorri, J. (2002). Actitud ante los nódulos tiroideos. *Anales de Pediatría*, 56, 62–67.

Gharib, H., Papini, E., Garber, J. R., Duick, D. S., Harrell, R. M., Hegedüs, L., ... Vitti, P. (2016). American association of clinical endocrinologists, american college of endocrinology, and associazione medici endocrinologi medical guidelines for clinical practice for the diagnosis and management of thyroid nodules – 2016 update. *Endocrine Practice*, 22(Supplement 1), 1–60. <https://doi.org/10.4158/EP161208.GL>

Giovanella, L., Bongiovanni, M., & Trimboli, P. (2013). Diagnostic value of thyroglobulin assay in cervical lymph node fine-needle aspirations for metastatic differentiated thyroid cancer. *Current Opinion in Oncology*, 25(1), 6–13. <https://doi.org/10.1097/CCO.0b013e32835a9ab1>

Giovanella, L., Feldt-Rasmussen, U., Verburg, F. A., Grebe, S. K., Plebani, M., & Clark, P. M. (2014). Thyroglobulin measurement by highly sensitive assays: focus on laboratory challenges. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 53(9), 1301–1314. <https://doi.org/10.1515/cclm-2014-0813>

Granados, M., Takahashi, A. M. L., Huerta, F. J. G., & Aslan, Z. A. T. (2014). Cáncer diferenciado de tiroides: una antigua enfermedad con nuevos conocimientos. *Gaceta Médica de México*, 150(1), 65–77.

Grani, G., & Fumarola, A. (2014). Thyroglobulin in lymph node fine-needle aspiration washout: a systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 99(6), 1970–1982. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-1098>

Guía Técnica 1 validación de Métodos y determinación de la incertidumbre de la medición_1.pdf. (s/f). Recuperado de http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia%20T%C3%A9cnica%201%20validaci%C3%B3n%20de%20M%C3%A9todos%20y%20determinaci%C3%B3n%20de%20la%20incertidumbre%20de%20la%20medici%C3%B3n_1.pdf

Guyton. (2013). Hormonas metabólicas tiroideas. En *Tratado de Fisiología Médica* (13a ed., pp. 931–940).

Haugen, B. R., Alexander, E. K., Bible, K. C., Doherty, G. M., Mandel, S. J., Nikiforov, Y. E., ... Wartofsky, L. (2015). 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*, 26(1), 1–133. <https://doi.org/10.1089/thy.2015.0020>

Instituto Nacional de Cancerología (México). (2010). *Manual de oncología: procedimientos medico quirúrgicos*. México: McGraw-Hill.

ISO 9000:2015(es), Sistemas de gestión de la calidad — Fundamentos y vocabulario. (s/f). Recuperado el 4 de diciembre de 2017, de <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:9000:ed-4:v1:es>

ISO/IEC 17025 - General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. (s/f). Recuperado el 4 de diciembre de 2017, de <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:pub:PUB100424>

Jeon, M. J., Kim, W. G., Jang, E. K., Choi, Y. M., Lee, Y.-M., Sung, T.-Y., ... Kim, W. B. (2015). Thyroglobulin level in fine-needle aspirates for preoperative diagnosis of cervical lymph node metastasis in patients with papillary thyroid carcinoma: two different cutoff values according to serum thyroglobulin level. *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association*, 25(4), 410–416. <https://doi.org/10.1089/thy.2014.0544>

- Jeon, M. J., Park, J. W., Han, J. M., Yim, J. H., Song, D. E., Gong, G., ... Kim, W. B. (2013). Serum antithyroglobulin antibodies interfere with thyroglobulin detection in fine-needle aspirates of metastatic neck nodes in papillary thyroid carcinoma. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98(1), 153–160. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-2369>
- Jiang, H.-J., Wu, C.-W., Chiang, F.-Y., Chiou, H.-Y. C., Chen, I.-J., & Hsiao, P.-J. (2018). Reliable sonographic features for nodal thyroglobulin to diagnose recurrent lymph node metastasis from papillary thyroid carcinoma. *Clinical Otolaryngology: Official Journal of ENT-UK; Official Journal of Netherlands Society for Oto-Rhino-Laryngology & Cervico-Facial Surgery*. <https://doi.org/10.1111/coa.13103>
- Konca, C., Yalcin, M. M., Cerit, T., & Ozkan, C. (2016). Lymph node fine-needle aspiration washout thyroglobulin in papillary thyroid cancer: Diagnostic value and the effect of thyroglobulin antibodies. *Endocrine Research*, 41(4), 281–289. <https://doi.org/10.3109/07435800.2016.1141936>
- Leenhardt, L., Erdogan, M. F., Hegedus, L., Mandel, S. J., Paschke, R., Rago, T., & Russ, G. (2013). 2013 European Thyroid Association Guidelines for Cervical Ultrasound Scan and Ultrasound-Guided Techniques in the Postoperative Management of Patients with Thyroid Cancer. *European Thyroid Journal*, 2(3), 147–159. <https://doi.org/10.1159/000354537>
- Li, J., Zhang, K., Liu, X., Hao, F., Liu, Z., & Wang, Z. (2016). Cervical lymph node thyroglobulin measurement in washout of fine-needle aspirates for diagnosis of papillary thyroid cancer metastases. *British Journal of Biomedical Science*, 73(2), 79–83. <https://doi.org/10.1080/09674845.2016.1173334>
- Li, Nugent, S. L., Straseski, J., Cooper, D., Riedel, S., Askin, F. B., & Sokoll, L. J. (2013). Thyroglobulin measurements in fine-needle aspiration cytology of lymph nodes for the detection of metastatic papillary thyroid carcinoma. *Cancer Cytopathology*, 121(8), 440–448. <https://doi.org/10.1002/cncy.21285>
- Martins, M. C., Maciel, R. M. B., Kasamatsu, T. S., Nakabashi, C. C. D., Camacho, C. P., Crispim, F., ... Biscolla, R. P. M. (2017). Clinical impact of thyroglobulin (Tg) and Tg autoantibody (TgAb) measurements in needle washouts of neck lymph node biopsies in the management of patients with papillary thyroid carcinoma. *Archives of Endocrinology and Metabolism*, 61(2), 108–114. <https://doi.org/10.1590/2359-3997000000241>

Moon, J. H., Kim, Y. I., Lim, J. A., Choi, H. S., Cho, S. W., Kim, K. W., ... Chung, J.-K. (2013). Thyroglobulin in washout fluid from lymph node fine-needle aspiration biopsy in papillary thyroid cancer: large-scale validation of the cutoff value to determine malignancy and evaluation of discrepant results. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98(3), 1061–1068. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-3291>

Papillary and Follicular Thyroid Cancer | ThyCa: Thyroid Cancer Survivors' Association, Inc. (s/f). Recuperado el 5 de enero de 2018, de <http://www.thyca.org/pap-fol/>

Richter, M. M. (2004). Electrochemiluminescence (ECL). *Chemical Reviews*, 104(6), 3003–3036. <https://doi.org/10.1021/cr020373d>

Roche Diagnostics. (s/f). cobas e 411 Compendio de información básica, (1), 88.

Seningen, J. L., Nassar, A., & Henry, M. R. (2012). Correlation of thyroid nodule fine-needle aspiration cytology with corresponding histology at Mayo Clinic, 2001-2007: an institutional experience of 1,945 cases. *Diagnostic Cytopathology*, 40 Suppl 1, E27-32. <https://doi.org/10.1002/dc.21566>

Shin, H. J., Lee, H. S., Kim, E.-K., Moon, H. J., Lee, J. H., & Kwak, J. Y. (2015). A Study on Serum Antithyroglobulin Antibodies Interference in Thyroglobulin Measurement in Fine-Needle Aspiration for Diagnosing Lymph Node Metastasis in Postoperative Patients. *PLOS ONE*, 10(6), e0131096. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131096>

Skoog, D., West, D., & Holler, J. (2015). *Fundamentos de Química Analítica*. (Novena). Recuperado de https://issuu.com/cengagelatam/docs/skoog_issuu

Sociedad de Lucha Contra el Cáncer/Registro Nacional de Tumores.Cueva,P;Yépez,J.editores. (2014). *Epidemiología del Cáncer en Quito 2006-2010* (15a ed.). Quito. Recuperado de https://issuu.com/solcaquito/docs/epidemiologia_de_cancer_en_quito_20

Sociedad de Lucha Contra el Cáncer/Registro Nacional de Tumores.Torres,C. (2014). Tiroides. En *Epidemiología del cáncer en Quito*. (15a ed., p. 144).

Trimboli, P., D'Aurizio, F., Tozzoli, R., & Giovanella, L. (2017). Measurement of thyroglobulin, calcitonin, and PTH in FNA washout fluids. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 55(7), 914–925. <https://doi.org/10.1515/cclm-2016-0543>

Van Herle, A. J., Vassart, G., & Dumont, J. E. (1979). Control of Thyroglobulin Synthesis and Secretion. *New England Journal of Medicine*, 301(5), 239–249. <https://doi.org/10.1056/NEJM197908023010504>

Velasco, S., Solar G, A., Cruz O, F., F, Q., Carlos, J., León R, A., ... Fardella, C. (2007). Tiroglobulina y sus limitaciones en el seguimiento del carcinoma diferenciado del tiroides: Report of two cases. *Revista médica de Chile*, 135(4), 506–511. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872007000400014>

VIM. (2012). *Vocabulario Internacional de Metrología. Conceptos fundamentales y generales y términos asociados*. (3a ed.). Recuperado de <http://www.cem.es/sites/default/files/vim-cem-2012web.pdf>

Wei, H., & Wang, E. (2011). Electrochemiluminescence of tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium and its applications in bioanalysis: a review: ECL of Ru(bpy)₃²⁺ and its applications in bioanalysis. *Luminescence*, 26(2), 77–85. <https://doi.org/10.1002/bio.1279>

Westgard. (2013). Validación Básica de Método. Recuperado de [file:///D:/Downloads/2015%20Validaci%C3%B3n%20B%C3%A1sica%20de%20M%C3%A9todo%20\(1\)%20\(1\).pdf](file:///D:/Downloads/2015%20Validaci%C3%B3n%20B%C3%A1sica%20de%20M%C3%A9todo%20(1)%20(1).pdf)

Zhao, H., Wang, Y., Wang, M., Zhang, Z., Wang, H., Zhang, B., & Guo, H. (2017). Influence of presence/absence of thyroid gland on the cutoff value for thyroglobulin in lymph-node aspiration to detect metastatic papillary thyroid carcinoma. *BMC Cancer*, 17. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3296-3>

Anexo 2. Oficio CEISH SOLCA

**SOCIEDAD DE LUCHA CONTRA EL CANCER
SOLCA- Núcleo de Quito**
Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos
Aprobación MSP, Oficio N° MSP-VGVS-2017-00006-O, Enero 5, 2017



Oficio N°51-2018 CEISH
Quito, 18 de junio de 2018

Señorita
Carla Suasnavas
ESTUDIANTE DE LA ESCUELA DE BIOQUIMICA CLINICA
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA

De mi consideración:

A través del presente, el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos SOLCA – Núcleo de Quito le informa que su trabajo de investigación, titulado **“Validación del método ECLIA para cuantificación de tiroglobulina en solución de lavado de aguja de aspirado de punción ganglionar cervical en pacientes con cáncer de tiroides tipo papilar del Hospital Oncológico SOLCA, Núcleo-Quito, durante el periodo agosto-septiembre 2018.”** Revisado simultáneamente al MSP se concluye que con las recomendaciones conjuntas su trabajo es aprobado para su ejecución.

La presente certificación tiene una duración de un año transcurrido, el cual se deberá solicitar una extensión conforme lo estipula el Reglamento del Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos (CEISH) SOLCA – Quito vigente. En toda correspondencia con el CEISH favor referirse al siguiente código de aprobación: CEISHSOLCAQ.OBS.18.038.

El investigador es responsable de la veracidad y autoría del estudio, además de emitir reportes de avance del mismo y al final una copia de la publicación del o los artículos científicos derivados de esta investigación.

Atentamente,

Dr. Henry Caballero N.
Presidente del Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos
SOLCA – Núcleo de Quito



Anexo 3. Oficio Ministerio de Salud Pública



Coordinación General de Desarrollo Estratégico en Salud
Dirección Nacional de Inteligencia de la Salud

Oficio Nro. MSP-DIS-2018-0135-O

Quito, D.M., 19 de julio de 2018

Asunto: EN RESPUESTA A LA SOLICITUD DE EVALUACIÓN DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN OBSERVACIONAL MSPCURI000266-2: " Validación del método ECLIA para cuantificación de tiroglobulina en solución de lavado de aguja de aspirado de punción ganglionar ..."

Señora
Carla Tamara Suasnavas Rosales
En su Despacho

De mi consideración:

En atención a la solicitud suscrita por Carla Tamara Suasnavas Rosales Egresada de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, referente a la aprobación del protocolo del estudio de Investigación denominado: " Validación del método ECLIA para cuantificación de tiroglobulina en solución de lavado de aguja de aspirado de punción ganglionar cervical en pacientes con cáncer de tiroides tipo papilar del Hospital Oncológico SOLCA, Núcleo de Quito, durante el periodo agosto-septiembre 2018", codificado por la Dirección Nacional de Inteligencia de la Salud (DIS) como: MSPCURI000266-2, que contiene las observaciones realizadas por la Dirección Nacional de Inteligencia de la Salud, mediante Oficio Nro. MSP-DIS-2018-0094-O de fecha 30 de mayo del 2018, una vez subsanadas las observaciones emitidas y cumplidos los requisitos mínimos para la evaluación del mismo y efectuando además con el criterio favorable de la Dirección Nacional de Estrategias de Prevención y Control se **APRUEBA** la versión adjunta del protocolo.

Le recordamos que una vez finalizada la investigación, es responsabilidad del investigador principal enviar a esta Dirección y a la Dirección Nacional de Estrategias de Prevención y Control los resultados de la misma; así como las publicaciones que se realicen como producto de este estudio.

La Dirección Nacional de Inteligencia de la Salud, aprueba los protocolos de los estudios observacionales en el ámbito de sus competencias, en base a una revisión de la calidad metodológica y ética de los estudios. Sin embargo, el contenido, la autoría y la responsabilidad sobre los resultados del estudio corresponden al Patrocinador y al Investigador Principal, exonerando al Ministerio de Salud Pública de cualquier acción legal que se derive por esta causa.

Cabe mencionar que si bien los resultados podrían contribuir a la salud pública, éstos no son de carácter vinculante para esta Cartera de Estado.



**Coordinación General de Desarrollo Estratégico en Salud
Dirección Nacional de Inteligencia de la Salud**

Oficio Nro. MSP-DIS-2018-0135-O

Quito, D.M., 19 de julio de 2018

Con sentimientos de distinguida consideración.

Atentamente,

Med. Adriana Elizabeth Granizo Martínez.
DIRECTORA NACIONAL DE INTELIGENCIA DE LA SALUD

Referencias:

- MSP-DNGA-SG-10-2018-8836-E

Anexos:

- 88360905179001529694322.pdf

- mspcuri000266-2.pdf

Copia:

Señor Doctor
Henry Marcelo Caballero Narvaez
**Presidente del Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos-ceish
SOCIEDAD DE LUCHA CONTRA EL CÁNCER-SOLCA QUITO**

Decano Facultad de Medicina Puce
Francisco Javier Pérez Pazmiño

Señor Especialista
Ronald Roberty Cedeño Vega
Director Nacional de Estrategias de Prevención y Control

Señorita Médico
Romina Costa Beltrán
Especialista de Enfermedades Crónicas no Transmisibles 1

Señora Magister
Miriam del Rocio Obando Rodriguez
Analista de la Dirección Nacional de Inteligencia

Señora Ingeniera
Gianina Lizeth Suarez Rodriguez
Especialista de Investigación y Análisis 1

Señorita Doctora
Cristina Magdalena Paez Aviles
Especialista de Investigación y Analisis 1

Señora
Tatiana Gulnara Beltran Loyo
Asistente



**Coordinación General de Desarrollo Estratégico en Salud
Dirección Nacional de Inteligencia de la Salud**

Oficio Nro. MSP-DIS-2018-0137-O

Quito, D.M., 23 de julio de 2018

Asunto: Alcance al oficio MSP-DIS-2018-0135-O: RESPUESTA A LA SOLICITUD DE EVALUACIÓN PROTOCOLO MSPCURI000266-2: " Validación del método ECLIA para cuantificación de tiroglobulina en solución de lavado de aguja de aspirado de punción ganglionar..."

Señora
Carla Tamara Suasnavas Rosales
En su Despacho

De mi consideración:

En alcance al oficio MSP-DIS-2018-0135-O, de fecha 19 de julio del 2018, se adjunta la versión aprobada del protocolo de investigación observacional titulado: "Validación del método ECLIA para cuantificación de tiroglobulina en solución de lavado de aguja de aspirado de punción ganglionar cervical en pacientes con cáncer de tiroides tipo papilar del Hospital Oncológico SOLCA, Núcleo de Quito, durante el periodo agosto – septiembre 2018", con codificación MSPCURI000266-2.

Agradezco su comprensión.

Con sentimientos de distinguida consideración.

Atentamente,

Med. Adriana Elizabeth Granizo Martínez.
DIRECTORA NACIONAL DE INTELIGENCIA DE LA SALUD

Anexos:
- mspcuri000266-2_2.pdf
- mspcuri000266-2_1.pdf

Copia:
Señor Doctor
Henry Marcelo Caballero Narvaez
Presidente del Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos-CEIH
SOCIEDAD DE LUCHA CONTRA EL CÁNCER-SOLCA QUITO

Decano Facultad de Medicina Puyo
Francisco Javier Pérez Pazmiño

Señor Especialista
Ronald Roberto Cedeño Vega
Director Nacional de Estrategias de Prevención y Control

Señorita Médico
Romina Costa Beltrán
Especialista de Enfermedades Crónicas no Transmisibles: I

Señora Magister
Miriam del Rocío Obando Rodríguez
Analista de la Dirección Nacional de Inteligencia

Señora Ingeniera
Giannina Liseth Suarez Rodriguez
Especialista de Investigación y Análisis: I

Señorita Doctora

Anexo 4. Consentimiento informado

Consentimiento Informado para investigación adaptación de la OMS y MSP.

Este formulario de Consentimiento Informado se dirige a pacientes adultos hombres y mujeres que son atendidos en el Hospital SOLCA Quito por presentar antecedentes de cáncer de tiroides de tipo papilar y que se les invita a participar en la investigación titulada “Validación del método ECLIA para cuantificación de tiroglobulina en solución de lavado de aguja de aspirado de punción ganglionar cervical en pacientes con cáncer de tiroides tipo papilar del Hospital Oncológico SOLCA, Núcleo-Quito, durante el periodo agosto-septiembre 2018”

Nombre del Investigador Principal: Carla Tamara Suasnavas Rosales

Nombre del Patrocinador: Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Nombre de la propuesta y versión:

Este documento de Consentimiento Informado tiene dos partes:

- Información (proporciona información sobre el estudio)
- Formulario de Consentimiento (para firmar si está de acuerdo en participar).

Se le dará una copia del documento completo de Consentimiento Informado

PARTE I: Información

Introducción

Mi nombre es Carla Tamara Suasnavas Rosales, soy egresada de la Facultad de Medicina, Carrera de Bioquímica Clínica de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Estoy investigando sobre la validación de una prueba que permita aumentar la sensibilidad de la técnica de punción y aspirado con aguja fina (técnica que se le acaba de realizar). Le voy a dar información e invitarle a participar de esta investigación. No tiene que decidir hoy si participar o no en esta investigación.

Puede que haya algunas palabras que no entienda. Por favor, me interrumpa cada vez que considere necesario o tenga una pregunta o inquietud, le dedicaré el tiempo necesario para explicar y aclarar sus dudas. Si más tarde tiene otras preguntas referentes a esta investigación, puede preguntarme a mí o al Dr. Carlos Fernando Flores Sampedro, jefe del laboratorio Clínico de SOLCA, quien es el director del presente trabajo de pregrado.

Propósito.

Existe evidencia científica que indica que la técnica de Punción y Aspirado con Aguja Fina (PAAF) que le acaban de realizar logra una óptima efectividad en la detección de ganglios cervicales metastásicos si se la combina con la medición de una proteína llamada tiroglobulina, la cual al ser medida en el líquido resultante del lavado de la aguja que el médico utilizó en su punción puede lograr que la punción sea 100% específica en la determinación de si usted está enfermo/a nuevamente. La razón por la que hacemos este estudio es que la medición de dicha proteína debe ser validada para que pueda ser implementada en el laboratorio.

Tipo de Intervención de Investigación

Esta investigación incluirá una única punción, que es la que le acaban de realizar.

Selección de participantes

Estamos invitando a todos los adultos con antecedentes de cáncer de tiroides papilar que son atendidos en el Hospital SOLCA Quito para participar en la investigación referente a la validación de una prueba que aumente el valor diagnóstico de la PAAF (Punción y Aspirado con Aguja Fina).

Participación Voluntaria

Su participación en la investigación es voluntaria. Usted tiene la posibilidad de participar o no de dicha investigación. Independientemente de si usted decidiera participar o no, los servicios que usted reciben en este Hospital permanecerán. Usted puede cambiar de opinión y dejar de participar aun cuando haya aceptado antes.

Procedimientos y Protocolos.

A. Procedimientos desconocidos

Para fines de esta investigación se necesitará el líquido obtenido del lavado de la aguja con la que el médico le realizó la punción, no se le realizará ningún otro procedimiento extra. Al final de la investigación su muestra biológica será eliminada.

B. Descripción del Proceso

Para fines de esta investigación no se le volverá a llamar al Hospital SOLCA Quito, a menos que su médico tratante así lo decida, de ser el caso es necesario que comprenda que su llamado no tendrá relación con esta investigación. El proceso para obtener la muestra descrita en esta investigación se lo realiza lavando la aguja utilizada en la punción con una pequeña cantidad de una solución que contiene sal; la muestra será transportada al Laboratorio Clínico del Hospital.

Duración

La investigación durará 5 meses en total. Sin embargo, usted no deberá acudir nuevamente al Hospital para fines de esta investigación.

Riesgos

No existe riesgos relacionados con esta investigación.

Beneficios

El beneficio para usted es indirecto, pero es probable que su participación nos ayude a encontrar una respuesta a la pregunta de investigación. Puede que no haya beneficio para la sociedad en el presente estado de la investigación, pero es muy probable que generaciones futuras se beneficien de la implementación de la prueba, especialmente pacientes con antecedentes de cáncer de tiroides tipo papilar.

Confidencialidad

La información que recojamos para fines de esta investigación se mantendrá confidencial. Se trabajarán por códigos para evitar poner su nombre. Solo los investigadores tendrán acceso a dicha información, la cual será resguardada en el computador del investigador principal. Los resultados del proceso de implementación de la prueba serán expuestos a las autoridades de SOLCA y de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Es importante aclarar que solo serán expuestos los resultados relacionados con el problema de investigación, en ningún documento se utilizará el nombre del paciente que consintió participar en el estudio.

Compartiendo los Resultados

Los hallazgos resultantes del proceso de validación e implementación de la nueva prueba serán publicados con el fin de que otros investigadores puedan aprender de nuestra investigación.

Derecho a negarse o retirarse

Si usted no desea participar en esta investigación no tiene obligación alguna de hacerlo. Usted será atendido con los mismos derechos y sin afectación alguna, aunque no participe en esta investigación. Si usted decide puede dejar de participar en la investigación en cualquier momento.

A Quién Contactar

Este proyecto ha sido evaluado y aprobado por el Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de

SOLCA, en caso de requerir más información, comuníquese con el Dr. Henry Caballero, presidente del Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos del Hospital Oncológico SOLCA Núcleo de Quito. Se adjunta el número de contacto del Dr. Henry Caballero: 0992947646

PARTE II: Formulario de Consentimiento

He sido invitado a participar en la investigación relacionada con la validación del método que mide una proteína llamada tiroglobulina. Entiendo que la muestra necesaria para esta investigación corresponde al líquido obtenido del lavado de la aguja fina con la que el doctor me realizó la punción, conozco además que la punción que me realizaron hace parte del diagnóstico clínico y no fue realizada solo para obtener la muestra que se utilizará en esta investigación. He sido informado de la ausencia de los riesgos, debido a que la muestra necesaria para este estudio es el líquido obtenido del lavado de la aguja, material considerado desechable. Sé que el beneficio es indirecto y que no recibiré incentivos económicos. Se me ha proporcionado el nombre del investigador principal y sé que puedo contactarlos por su nombre y número de teléfono. He leído la información proporcionada o me ha sido leída. He tenido la oportunidad de realizar preguntas y se me ha contestado todas las preguntas que he realizado. Consiento voluntariamente participar en esta investigación como participante y soy consciente de que puedo retirarme de la investigación cuando lo desee, sin que me afecte en ninguna manera mi cuidado médico.

Nombre del Participante _____ Firma del Participante _____

Fecha _____

Día/mes/año

Si es analfabeto

He sido testigo de la lectura exacta del documento de consentimiento para el potencial participante y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmando que el individuo ha dado consentimiento libremente.

Nombre del testigo _____

Huella dactilar del participante.

Firma del testigo _____

Fecha _____

Día/mes/año

He leído con exactitud o he sido testigo de la lectura exacta del documento de consentimiento informado para el potencial participante y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmando que el individuo ha dado consentimiento libremente.

Nombre del Investigador _____

Firma del Investigador _____

Fecha _____

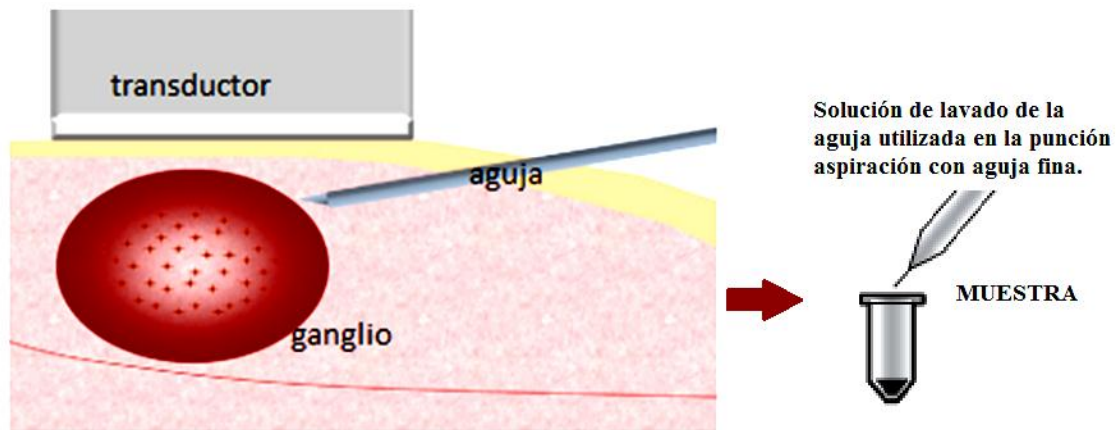
Día/mes/año

Se le ha proporcionado al participante una copia de este documento de Consentimiento Informado

Nombre del Participante

Firma del Participante

Anexo 5. Técnica PAAF



Esquema de la punción guiada con ecógrafo. El transductor es colocado sobre la lesión para posteriormente introducir la aguja desde unos centímetros más allá del borde del transductor. La aguja es dirigida hacia el objetivo siguiendo el plano de corte ecográfico. Tomada de (Del Cura, 2010)

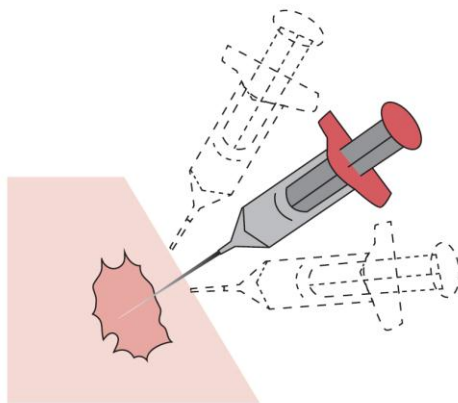


Figura 6-8. Técnica de la punción en la Biopsia por Aspiración con aguja fina. Lo óptimo es efectuar tres aspiraciones con un mínimo de 30 pases con la aguja en cada aspiración modificando el ángulo de entrada de la aguja para conseguir que la muestra sea lo más representativa posible.

Tomado de (Instituto Nacional de Cancerología (México), 2010)



Imagen que corresponde a la toma de muestra por punción eco dirigida. (Suasnavas,2018)

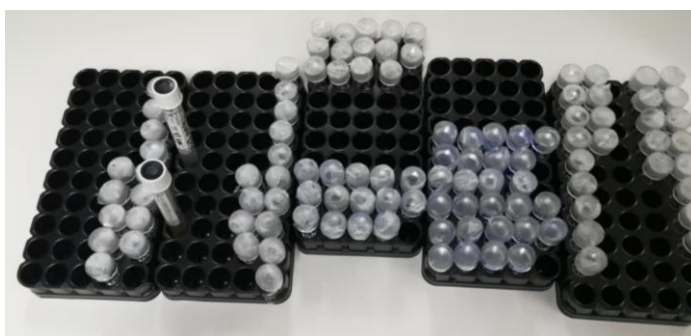
Anexo 6. Alícuotas de solución salina al 0.9% y otras evidencias



Imagen que evidencia la formación de alícuotas de solución salina al 0.9 %.
(Suasnavas,2018)



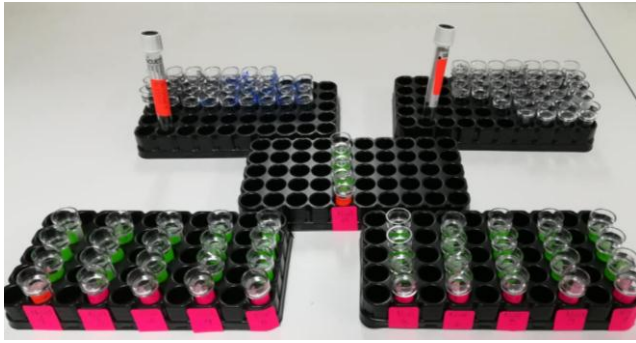
Corrida analítica del ensayo de Interferencia
(Suasnavas,2018)



Muestras alícuotadas (Suasnavas,2018)



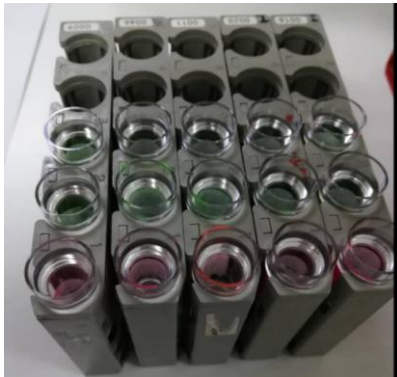
Muestras en congelación a -20 grados.
(Suasnavas,2018)



Ensayo de linealidad
(Suasnavas,2018)



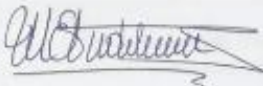
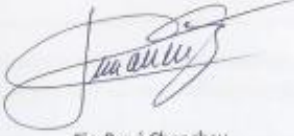



Corrida analítica linealidad
(Suasnavas,2018)



Corrida analítica día uno, precisión y sesgo.
(Suasnavas,2018)

Anexo 7. Certificado de calibración pipeta ACCUMAX PRO

 CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN SOLUCIONES ESPECIALIZADAS EN CALIDAD Y METROLOGÍA		 Servicio de Acreditación Ecuatoriano Acreditación N° SAE LGA 15-001 LABORATORIO DE CALIBRACIÓN
		Adhesivo No. 04155
Pedido No.	2018-CA-365	Certificado No. SECM-V-2018-456
Fecha de calibración	2018-07-12	Este certificado de calibración documenta la trazabilidad hacia el Patrón Nacional de masa del Laboratorio Nacional de Metrología del Ecuador, el cual es trazable a la realización de la unidad de medida de acuerdo al Sistema Internacional de Unidades (SI).
Objeto	Pipeta de pistón tipo A / D1	
Marca	Accumax PRO	La incertidumbre de medida se obtuvo multiplicando la incertidumbre estándar combinada por un factor de cobertura $k=2$, el cual corresponde a un nivel de confianza de aproximadamente 95% bajo la suposición de que la función de densidad de probabilidad del mensurando es normal. La incertidumbre de la medición fue estimada de acuerdo al documento "Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement". BIPM. First edition - September 2008.
Modelo	****	
Serie	JD497563	
Identificación	****	
Rango	100 µL	
División de Escala:	0,5 µL	Es responsabilidad del usuario establecer la fecha de una nueva calibración del instrumento. Este documento no es un certificado de calidad, relaciona los resultados con los ítems calibrados en el momento de la calibración. El tiempo de validez de los resultados depende tanto de las características del instrumento calibrado como de las prácticas para su manejo y uso.
Clase de exactitud:	****	
Material:	Plástico (polipropileno)	No es recomendable la reproducción parcial de este certificado ya que puede dar lugar a interpretaciones equivocadas de sus resultados.
Ciente	SOLCA NUCLEO QUITO	
Dirección	Av. De Los Pinos y Eloy Alfaro	
Observaciones	****	
SECalMet no se responsabiliza del uso indebido de este certificado		
Calibrado por:	Autorizado por:	Fecha de emisión:
		2018-07-12
Dra. Mónica Gualotuña Técnico de laboratorio	Fis. René Chanchay Director Técnico	 SECALMET SOLUCIONES ESPECIALIZADAS EN CALIDAD Y METROLOGÍA CIA. LTDA.
Nayón: Calle Segundo Corella N1-37 y calle Quito; Quito-Ecuador; Tel: 02-2884126 / 0990687624 / 0995230691 e-mail: secalmet.cia.ltda@gmail.com ; web: http://secalmet.jimdo.com		

SOLCA NÚCLEO QUITO

Cert. No.: SECM-V-2018-456

Fecha de calibración: 2018-07-12

Pedido No.: 2018-CA-365

Procedimiento: Procedimiento PC 09, Procedimiento para calibración de medidas de volumen, método gravimétrico, basado en el procedimiento normalizado de operación SOP No. 14 del NIST y en la Guía técnica sobre trazabilidad en incertidumbre en los servicios de calibración de recipientes volumétricos por el método gravimétrico del CENAM.

Lugar de la calibración:

La calibración se realizó en el Laboratorio de SECalMet.

Condiciones ambientales del ensayo						
T _o	T _f	P _o	P _f	H _o	H _f	Dens. del aire
°C	°C	hPa	hPa	%	%	g/cm ³
20,9	20,9	748,3	748,3	51,5	51,5	0,000880

Patrones y equipos utilizados

Patrones:

Agua destilada grado 3, según clasificación en la norma ISO 3696.

Conductividad eléctrica: 1,04 µS/cm

Balanzas

• Radwag; modelo: AS 60/220.R2; Serie: 444451; Id.: Balanza No. 7; Certificado No. SECM-B-2018-006

Resultados obtenidos

VOLUMEN PARA CONTENER

No.	Volumen Nominal a 20 °C µL	Volumen Medido a 20 °C µL	Corrección µL	U; k=2 µL	E.M.P µL

VOLUMEN PARA ENTREGAR

No.	Volumen Nominal a 20 °C µL	Volumen Medido a 20 °C µL	Corrección µL	U; k=2 µL	E.M.P µL
1	10	10,56	0,56	0,30	0,80
2	50	50,19	0,19	0,30	0,80
3	100	100,49	0,49	0,30	0,80

EVALUACIÓN:

Los errores del instrumentos son menores o iguales a los errores máximos permitidos establecidos en la norma NTE INEN-ISO 8655-2, primera edición, 2014-01, Aparatos volumétricos accionados mediante pistón parte 2: Pipetas tipo pistón, numeral 7.2, tabla 1.

Calibrado por: Dra. Mónica Gualotuña

SECalMet

SECALMET SOLUCIONES
ESPECIALIZADAS EN CALIDAD Y
METROLOGÍA CIA. LTDA.


Revisado por: Fis. René Chanchay

Anexo 8. Certificado de calibración pipeta GILSON.

CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN

SECalMet

SOLUCIONES ESPECIALIZADAS EN CALIDAD Y METROLOGÍA





Servicio de Acreditación Ecuatoriano
Acreditación N° SAE LCA 15-001
LABORATORIO DE CALIBRACIÓN

Adhesivo No. 04156

Pedido No.	2018-CA-365	Certificado No. SECM-V-2018-457
Fecha de calibración	2018-07-12	<p>Este certificado de calibración documenta la trazabilidad hacia el Patrón Nacional de masa del Laboratorio Nacional de Metrología del Ecuador, el cual es trazable a la realización de la unidad de medida de acuerdo al Sistema Internacional de Unidades (SI).</p> <p>La incertidumbre de medida se obtuvo multiplicando la incertidumbre estándar combinada por un factor de cobertura $k=2$, el cual corresponde a un nivel de confianza de aproximadamente 95% bajo la suposición de que la función de densidad de probabilidad del mensurando es normal. La incertidumbre de la medición fue estimada de acuerdo al documento "Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement". BIPM. First edition - September 2008.</p> <p>Es responsabilidad del usuario establecer la fecha de una nueva calibración del instrumento. Este documento no es un certificado de calidad, relaciona los resultados con los items calibrados en el momento de la calibración. El tiempo de validez de los resultados depende tanto de las características del instrumento calibrado como de las prácticas para su manejo y uso.</p> <p>No es recomendable la reproducción parcial de este certificado ya que puede dar lugar a interpretaciones equivocadas de sus resultados.</p>
Objeto	Pipeta de pistón tipo A / D1	
Marca	GILSON	
Modelo	pipetman	
Serie	NE71075	
Identificación	****	
Rango	1000 μ L	
División de Escala:	2 μ L	
Clase de exactitud:	****	
Material:	Plástico (polipropileno)	
Cliente	SOLCA NUCLEO QUITO	
Dirección	Av. De Los Pinos y Eloy Alfaro	
Observaciones	****	

SECalMet no se responsabiliza del uso indebido de este certificado

<p>Calibrado por:</p>  <p>Dra. Mónica Gualotuffa Técnico de laboratorio</p>	<p>Autorizado por:</p>  <p>Fis. René Chanchay Director Técnico</p>	<p>Fecha de emisión: 2018-07-12</p> <div style="border: 2px solid black; padding: 5px; text-align: center; margin: 10px 0;"> <p>SECalMet</p> <p style="font-size: x-small;">SECALMET SOLUCIONES ESPECIALIZADAS EN CALIDAD Y METROLOGÍA CIA. LTDA.</p> </div>
---	--	--

Nayón: Calle Segundo Corella N1-37 y calle Quito; Quito-Ecuador; Tel: 02-2884126 / 0990687624 / 0995230691
e-mail: secalmet.cia.ltda@gmail.com ; web: http://secalmet.jimdo.com

FG 19-02 (2014-08-24)
Edición: 01
Hoja 1 de 2

SOLCA NUCLEO QUITO

Cert. No.: SECM-V-2018-457

Fecha de calibración: 2018-07-12

Pedido No.: 2018-CA-365

Procedimiento: Procedimiento PC 09, Procedimiento para calibración de medidas de volumen, método gravimétrico, basado en el procedimiento normalizado de operación SOP No. 14 del NIST y en la Guía técnica sobre trazabilidad en incertidumbre en los servicios de calibración de recipientes volumétricos por el método gravimétrico del CENAM.

Lugar de la calibración:

La calibración se realizó en el Laboratorio de SECaMet.

Condiciones ambientales del ensayo

To °C	Tf °C	Po hPa	Pf hPa	Ho %	Hf %	Dens. del aire g/cm ³
21	20,9	746,2	746,2	49,5	48,6	0,000878

Patrones y equipos utilizados

Patrones:

Agua destilada grado 3, según clasificación en la norma ISO 3696.

Conductividad eléctrica: 1,04 µS/cm

Balanzas

- Radwag; modelo: AS 60/220.R2; Serie: 444451; Id.: Balanza No. 7; Certificado No. SECMI-B-2018-006

Resultados obtenidos

VOLUMEN PARA CONTENER

No.	Volumen Nominal a 20 °C µL	Volumen Medido a 20 °C µL	Corrección µL	U; k=2 µL	E.M.P µL

VOLUMEN PARA ENTREGAR

No.	Volumen Nominal a 20 °C µL	Volumen Medido a 20 °C µL	Corrección µL	U; k=2 µL	E.M.P µL
1	100	101,0	1,0	3,0	8,0
2	500	496,9	-3,1	3,0	8,0
3	1000	993,6	-6,4	3,0	8,0

EVALUACIÓN:

Los errores del instrumentos son menores o iguales a los errores máximos permitidos establecidos en la norma NTE INEN-ISO 8655-2, primera edición, 2014-01, Aparatos volumétricos accionados mediante pistón parte 2: Pipetas tipo pistón, numeral 7.2, tabla 1.

Calibrado por: Dra. Mónica Gualotufía

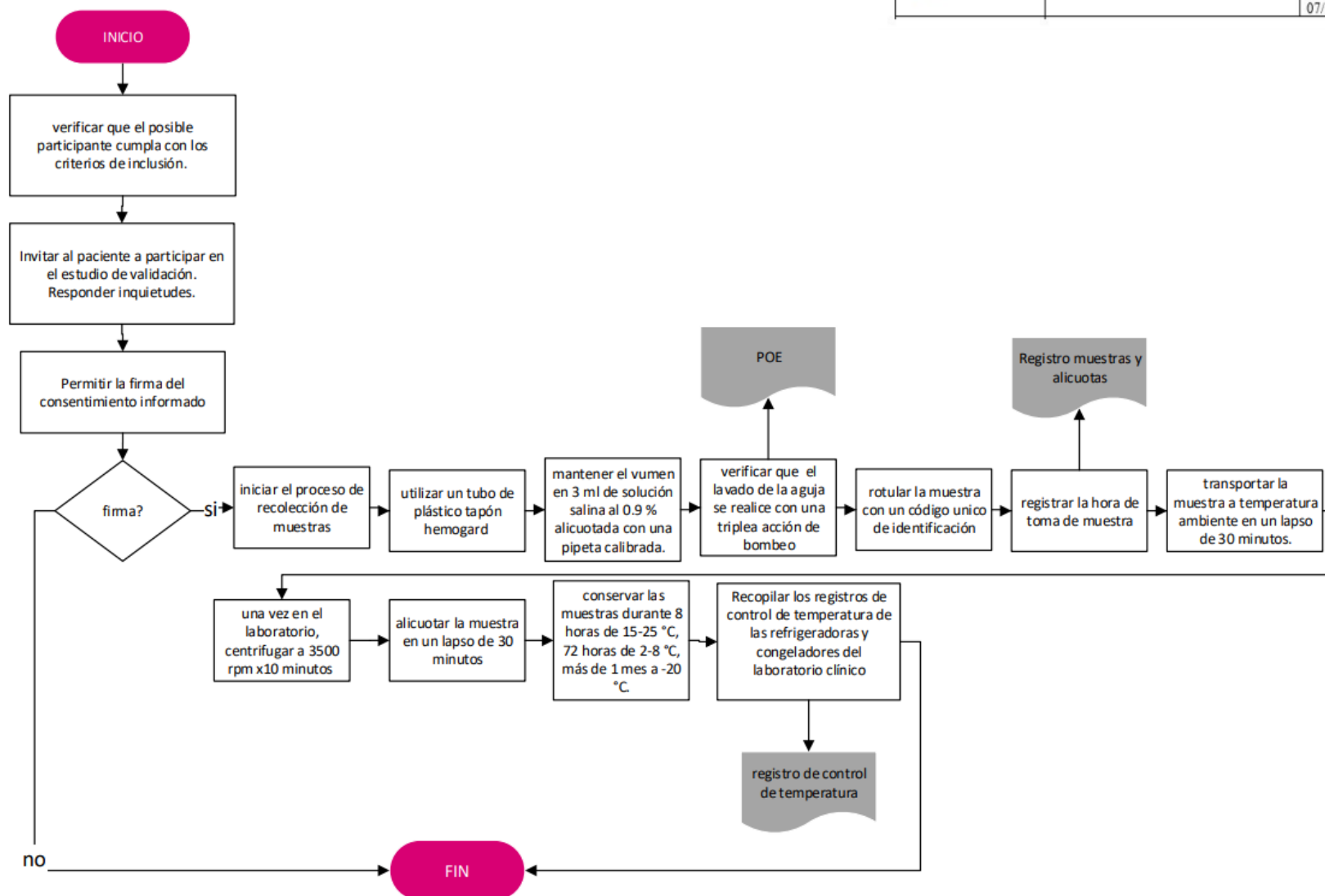
SECaMet


SECALMET SOLUCIONES
ESPECIALIZADAS EN CALIDAD Y
METROLOGÍA CÍA. LTDA.

Revisado por: Fls. René Chanchay

Anexo 9. Diagrama de flujo preanálisis

RECOLECCIÓN Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS



Elaborado por: Carla Suasnavas	Revisado por: Dr. Carlos Flores.	Aprobado por: Dr. Carlos Flores
 Pontificia Universidad Católica del Ecuador		Versión: 1 Vigente a partir de: 07/10/2018
DIAGRAMAS DE FLUJO PARA EL MANEJO DEL EQUIPO COBAS 6000-MODULAR COBAS e601.		


Anexo 10. *Actividades realizadas en la fase de familiarización con el método*

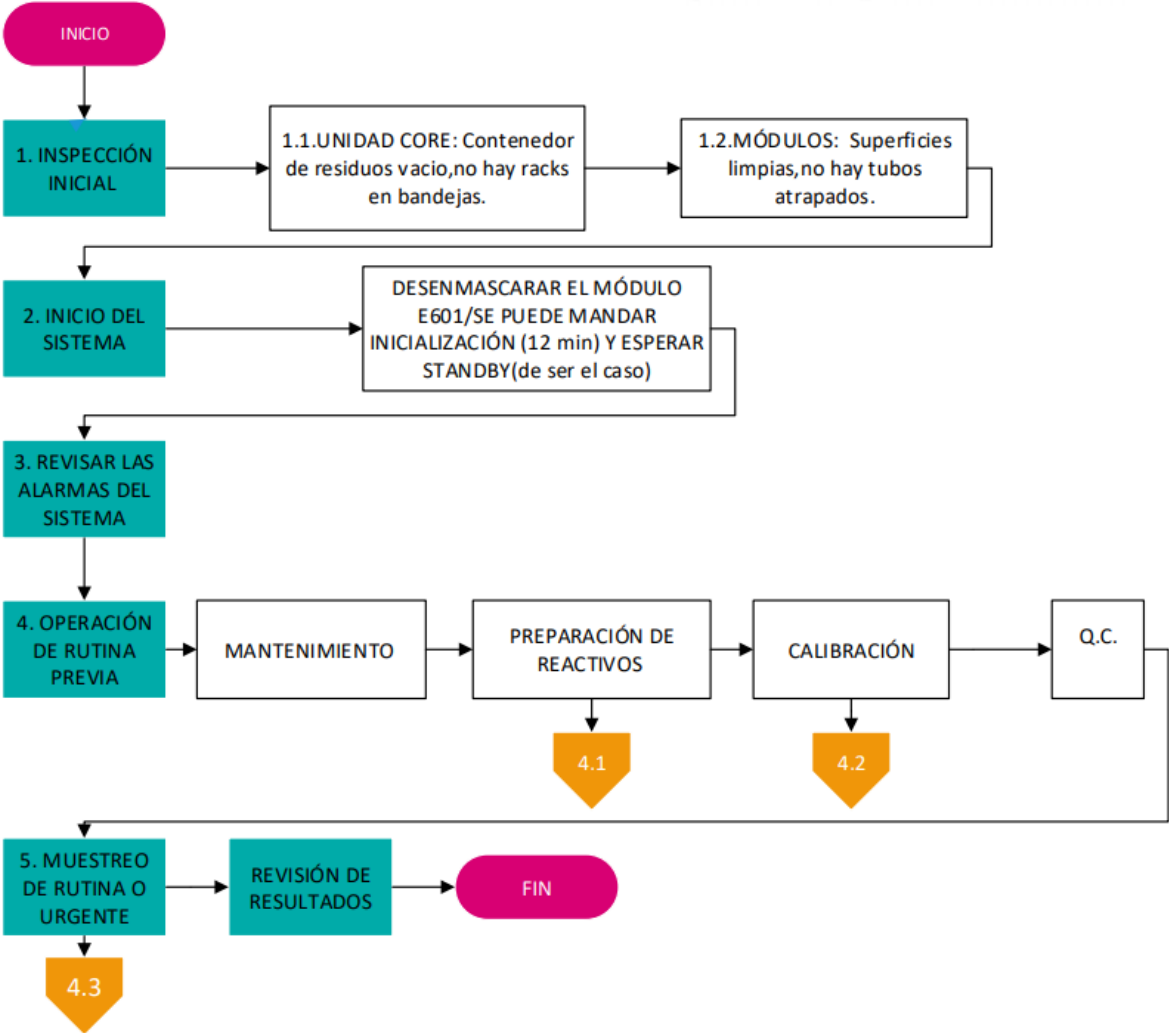
TEMAS	FECHAS	N° HORAS	TRABAJO AUTÓNOMO DE LA ESTUDIANTE	ESTRATEGIAS DE APRENDIZAJE	RESULTADOS DE APRENDIZAJE	EVIDENCIAS
			Actividades			Descripción
1. Unidad de control, cobas link y unidad core	Viernes 6 y lunes 9 de Abril del 2018.	4 por día	Familiarización con los componentes del modulo e 601.	Lectura de manual del operador.	Conocimiento teórico de los componentes del área de reactivos, medición, Pre Wash, fungibles y reactivos auxiliares.	Operación del quipo, desarrollo del cuaderno de trabajo.
	10 de Abril de 2018	4	Conocimiento de las especificaciones del sistema.	Desarrollo de listas de chequeo que evidencien el cumplimiento de condiciones de operación	Aprendizaje del fundamento teórico y práctico de la medición de la conductividad eléctrica del agua y monitoreo de condiciones ambiental.	Desarrollo del cuaderno de trabajo y lista de chequeo para el cumplimiento de la conductividad eléctrica del agua y temperatura ambiental.
	11 y 12 de Abril de 2018	4 por día	Familiarización con los componentes de la unidad core cu 150	Lectura de manual del operador.	Conocer las especificaciones referentes a la unidad de muestreo de racks y código de barras.	Desarrollo del cuaderno de trabajo
	13 de Abril de 2018	4	Conocimiento del cobas link	Lectura de manual del operador.	Busqueda de información en la biblioteca del cobas link y manejo del sistema de ayuda.	Desarrollo del cuaderno de trabajo y operación del equipo.

3. Interfaz del usuario	24 de Abril de 2018	4	Lectura del manual del operador	Correlación teórico-práctica	Familiarizarse con las diferentes aplicaciones relacionadas con la panorámica del sistema y operación diaria.	Operación del quipo.
	25 de Abril de 2018	4	Lectura del manual del operador	Correlación teórico-práctica	Conocer la utilidad de la barra de estado y pestaña de los menús: Trabajo,Reactivos,Calibración, CC y Utilidades.	Operación del quipo.
4. Calibración 4.1 Tipos de calibración. 4.2 Fundamento de la calibración del cobas e601. 4.3 Pantalla calibración: solicitud de calibraciones, revisión de resultados, descarga de datos de los calibradores.	26 de Abril de 2018	4	Lectura del manual del operador	Correlación teórico-práctica	La estudiante identifica los calibradores utilizados para los procesos de calibración. La estudiante puede interpretar resultados de calibración e identificación de alarmas.	Operación del quipo.
5. Control de Calidad	3 de Mayo de 2018	4	Lectura del manual del operador. Lectura del artículo "Prácticas básicas de QC" Westgard 2013.	Interpretación de gráficas de control de calidad, aplicación de multireglas de Westgard e identificación de errores aleatorio y sistemático.	La estudiante puede identificar tendencias, errores aleatorios y sistemáticos y las diferentes causas de los mismos mediante la aplicación de las reglas de WESTGARD. La estudiante identifica los materiales de control de calidad utilizados en el laboratorio.	Desarrollo del cuaderno de trabajo y operación del quipo.
6. Mantenimiento preventivo	4 de Mayo de 2018	4	Lectura del manual del operador	Correlación teórico-práctica	La estudiante puede realizar el mantenimiento diario del equipo.	Operación del quipo.
	7-14 de Mayo de 2018	0	La estudiante asiste a vinculación con la comunidad para tener sus horas de acción social.			


Anexo 11. Diagrama de flujo de la preparación del equipo Cobas e 601

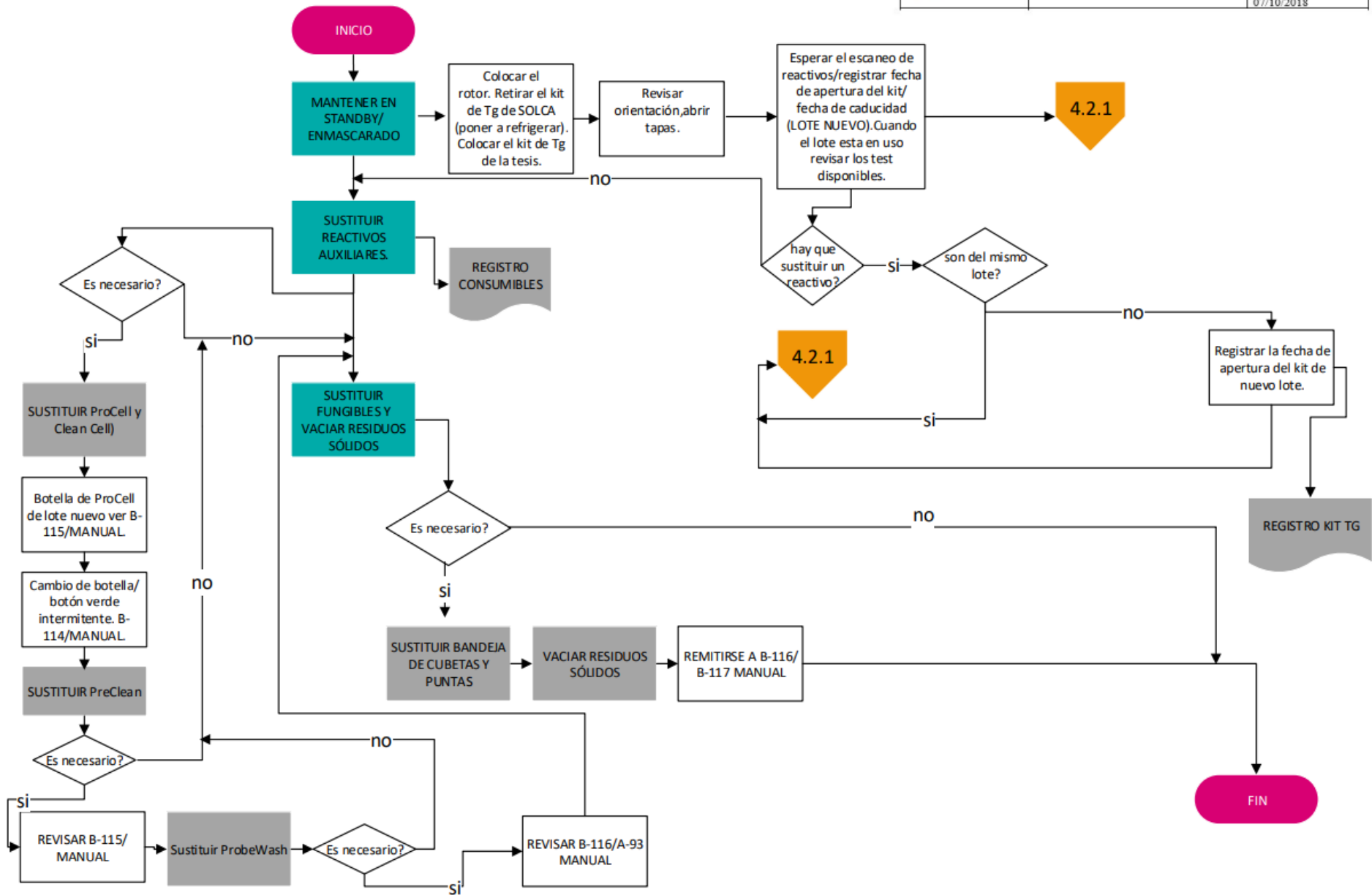
1. OPERACIÓN DIARIA/TAREAS DE RUTINA PARA PREPARAR EL ANALIZADOR

Elaborado por: Carla Suasnavas	Revisado por: Dr. Carlos Flores.	Aprobado por: Dr. Carlos Flores
 Pontificia Universidad Católica del Ecuador		Versión: 1
DIAGRAMAS DE FLUJO PARA EL MANEJO DEL EQUIPO COBAS 6000-MODULAR COBAS e601.		Vigente a partir de: 07/10/2018




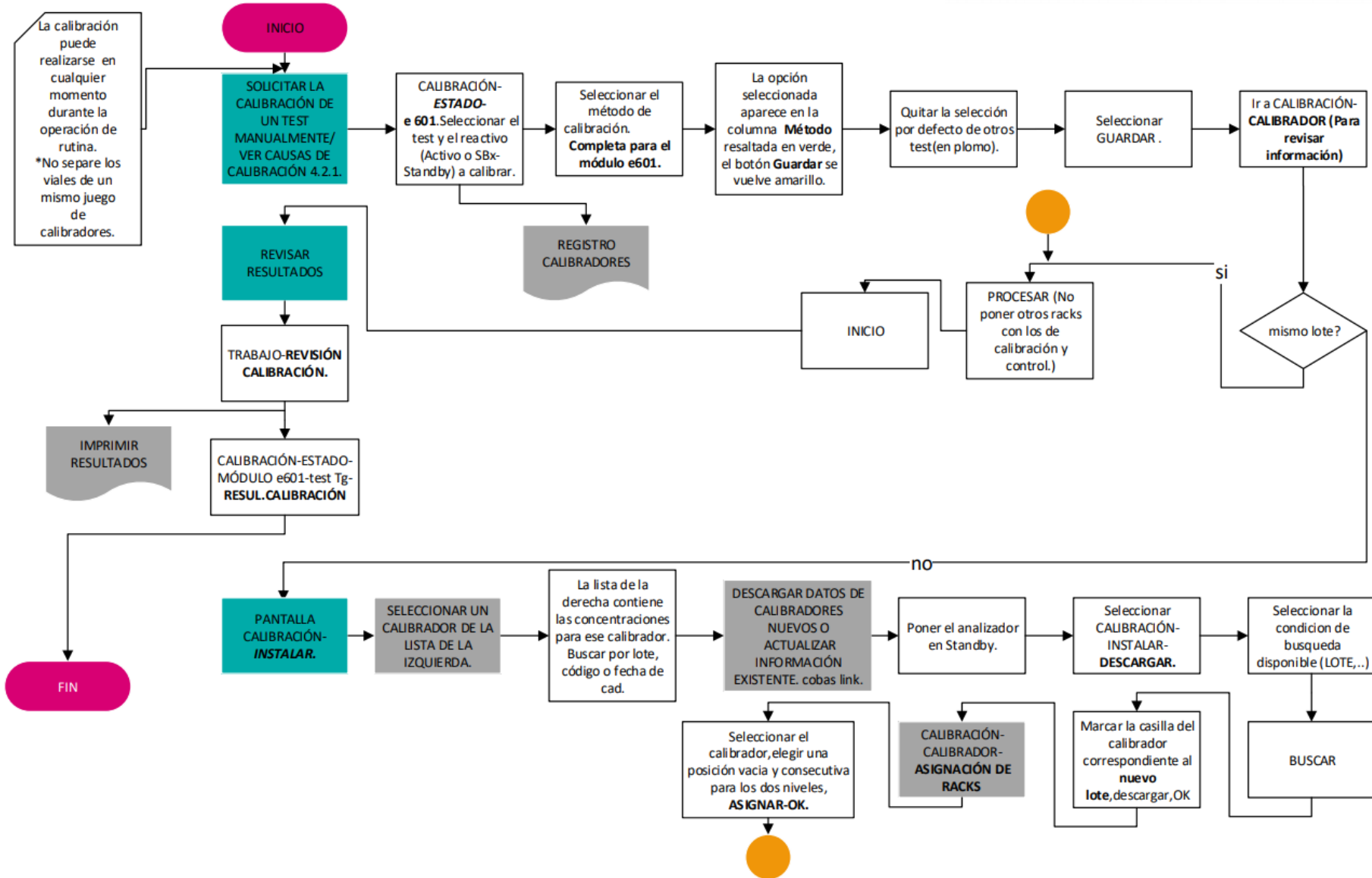
4.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Elaborado por: Carla Suasnavas	Revisado por: Dr. Carlos Flores.	Aprobado por: Dr. Carlos Flores
 Pontificia Universidad Católica del Ecuador		Versión: 1 Vigente a partir de: 07/10/2018
DIAGRAMAS DE FLUJO PARA EL MANEJO DEL EQUIPO COBAS 6000-MODULAR COBAS e601.		



4.2 CALIBRACIÓN: Verificar la estabilidad de los reactivos y del sistema en conjunto.

Elaborado por: Carla Suasnavas	Revisado por: Dr. Carlos Flores.	Aprobado por: Dr. Carlos Flores
	DIAGRAMAS DE FLUJO PARA EL MANEJO DEL EQUIPO COBAS 6000-MODULAR COBAS e601.	Versión: 1
		Vigente a partir de: 07/10/2018



Anexo 12. Registros generados en el proceso de validación		LOTE DE REACTIVO:29666601 LOTE DEL CONTROL PCU1:27075890 LOTE DEL CONTROL PCU2:27076190 EQUIPO MODULAR COBAS 6000/e 601			
FECHA ↓	RANGO →	NIVEL 1 (19.4-28 ng/mL)	NIVEL 2 (68.1-98.1 ng/mL)	OBSERVACIONES	ACCIÓN CORRECTIVA
18/09/2018		22.69	77.79		
		Calibración de pack			
2/10/18		21.92	90.06		
3/10/18		22.0	86.06		
4/10/18		26.61	93.12	Es un valor aberrante según test de Grubs/MEDLABQC	Se repite la medición se obtiene nuevamente el mismo valor, sin embargo, los valore corridos no muestran datos aberrantes en relación a dos días anteriores en los que se corrió el control. Como la discordancia es evidenciada solo en el nivel bajo se decide esperar el valor de control de calidad del día posterior.
5/10/18		27.08	98.79 ↑		Se evidencia una tendencia y el segundo nivel presenta una alarma por exceder el rango de referencia.

5/10/2018	Re-calibración/se genera calibración de pack de reactivo y no de lote.			Se decide pasar otro lote de control con un mayor periodo de vida útil.
	LOTE DE REACTIVO:29666601 LOTE DEL CONTROL PCU1:19428600 LOTE DEL CONTROL PCU2:19428800			
	NIVEL 1 (18.4-26.4 ng/mL)	NIVEL 2 (73.4-105.6 ng/mL)	OBSERVACIONES	ACCIÓN CORRECTIVA
5/10/2018	24.21	93.07		
5/10/2018	22.83	93.24		
				Para probar si los valores atípicos del lote de control anterior se debieron a la inestabilidad de este se decidió correr nuevamente los controles de lote anterior, los valores obtenidos se resaltan en verde
5/10/2018	24.00	97.77		
6/10/2018	23.72	92.28		
7/10/2018	22.94	96.50		Le quedaban solo 8 test al pack de reactivo que tuvo estos valores de control de calidad.
7/10/2018	27.3	110.2		Se pasan nuevamente los controles porque se termina los test en el pack de reactivo y porque se sabía que el nuevo pack se configuraría con la calibración de lote. Se evidencian valores altos.
8/10/2018	RE-CALIBRACIÓN /se genera calibración de lote para el			

	nuevo pack de reactivo			
8/10/2018	22.23	91.83		
9/10/2018	24.14	86.51		Lote 27075
10/10/2018	22.61	79.15		Lote 270758
11/10/2018	22.96	93.03		Lote 194286

REGISTROS

```

Monitor Calibración                08/10/18  16:35
08/10/18 bmserv E -2
16:32:53 ;No pudo generarse L-Calib! Liberada como R-Calib. por el sistema

TEST  UD.      LOTE CALIB.  LTE      SERIE
-----
TG II  ng/mL      00276694    00296666 033135
-----S1-----S2-----
REF.      0.150      181.0
SEÑAL 1   1854      906798
SEÑAL 2   1914      917457
Monotony  --         --
Diff.     --         --
Dupl.     --         --
SysErr    --         --
FACTOR    1.06

```

```

Monitor Calibración                10/10/18  15:35
10/10/18 bmserv E -2
15:33:05 Se ha generado L-Calib.

TEST  UD.      LOTE CALIB.  LTE      SERIE
-----
TG II  ng/mL      00276694    00296666 033154
-----S1-----S2-----
REF.      0.150      181.0
SEÑAL 1   1544      685097
SEÑAL 2   1550      696021
Monotony  --         --
Diff.     --         --
Dupl.     --         --
SysErr    --         --
FACTOR    1.00

```

```

Monitor Calibración                02/10/18  15:38
02/10/18 bmserv E -2
15:37:40 ;No pudo generarse L-Calib! Liberada como R-Calib. por el sistema

TEST  UD.      LOTE CALIB.  LTE      SERIE
-----
TG II  ng/mL      00276694    00296666 033139
-----S1-----S2-----
REF.      0.150      181.0
SEÑAL 1   1678      790664
SEÑAL 2   1630      775527
Monotony  --         --
Diff.     --         --
Dupl.     --         --
SysErr    --         --
FACTOR    1.00

```

Monitor Calibración 18/09/18 14:53

18/09/18 bmserv E -2
14:53:07 ;No se pudo generar L-Calib!

TEST	UD.	LOTE CALIB.	LTE	SERIE
TG II	ng/mL	00276694	00296666	033139
REF.	0.150	181.0		
SEÑAL 1	NG	NG		
SEÑAL 2	NG	NG		
Monotony	--	--		
Diff.	--	--		
Dupl.	--	--		
SysErr	--	--		
FACTOR	0.000			

18/09/18 bmserv E -2
15:18:34 Se ha generado L-Calib.

TEST	UD.	LOTE CALIB.	LTE	SERIE
TG II	ng/mL	00276694	00296666	033139
REF.	0.150	181.0		
SEÑAL 1	1600	778216		
SEÑAL 2	1579	780589		
Monotony	--	--		
Diff.	--	--		
Dupl.	--	--		
SysErr	--	--		
FACTOR	1.00			

REGISTRO DE CONDUCTIVIDAD DE AGUA COBAS E411

Año: 2018 Mes: Octubre Conductividad máxima: _____

DÍA	CONDUCTIVIDAD	NOMBRE ANALISTA	FIRMA ANALISTA
1			
2	0	Carla Suesnavas	<i>[Firma]</i>
3	0	Carla Suesnavas	<i>[Firma]</i>
4	0	Carla Suesnavas	<i>[Firma]</i>
5	0	Carla Suesnavas	<i>[Firma]</i>
6	0	Carla Suesnavas	<i>[Firma]</i>
7	0	Carla Suesnavas	<i>[Firma]</i>
8	0	Carla Suesnavas	<i>[Firma]</i>
9	0	Carla Suesnavas	<i>[Firma]</i>
10	0	Carla Suesnavas	<i>[Firma]</i>
11	0	Carla Suesnavas	<i>[Firma]</i>
12			
13			

REGISTRO DE MANTENIMIENTO

SISTEMA: Cobas 6000 - E601

Mes: Octubre Año: 2018

No. de serie: _____
Versión Software: _____

 REVISION: 00

DIARIO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
Limpieza de superficies del instrumento (E)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Limpieza pipetas y sippers (E)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Revisión de Reactivos	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
SEMANAL																															
Limpieza de aguas de procel / clean cell y los electrodos y sustituir los depósitos (E)										X																					
Limpieza del mezclador de prelección y estación de separación (E)										X																					
Limpieza del incubador (E)										X																					
Limpieza del borfo de las cubetas (E)										X																					
Limpieza del agitador de micropartículas (E)										X																					
Limpieza de estaciones de lavado (E)										X																					
QUINCENAL																															
Limpieza paso flujo líquido (LFC) (E)																															
BIMENSUAL																															
Limpieza de rotor de reactivos																															
Limpieza de filtros de PC y CC																															

OBSERVACIONES:
SIGLAS E: E601

Firma responsable: *[Firma]*

Anexo 13 Esquema de dilución

S=5 samples

- 1: Low (L)
- 2: 0.75L+0.25H
- 3: 0.50L+0.50H
- 4: 0.25L+0.75H
- 5: High (H)

S=6 samples

- 1: Low (L)
- 2: 0.8L+0.2H
- 3: 0.6L+0.4H
- 4: 0.4L+0.6H
- 5: 0.2L+0.8H
- 6: High (H)

S=7 samples

- 1: Low (L)
- 2: 0.833L+0.167H
- 3: 0.667L+0.333H
- 4: 0.500L+0.500H
- 5: 0.333L+0.667H
- 6: 0.167L+0.833H
- 7: High (H)

S=8 samples

- 1: Low (L)
- 2: 0.857L+0.143H
- 3: 0.714L+0.286H
- 4: 0.571L+0.429H
- 5: 0.429L+0.571H
- 6: 0.286L+0.714H
- 7: 0.143L+0.857H
- 8: High (H)

S=9 samples

- 1: Low (L)
- 2: 0.875L+0.125H
- 3: 0.750L+0.250H
- 4: 0.625L+0.375H
- 5: 0.500L+0.500H
- 6: 0.375L+0.625H
- 7: 0.250L+0.750H
- 8: 0.125L+0.875H
- 9: High (H)

S=10 samples

- 1: Low (L)
- 2: 0.889L+0.111H
- 3: 0.778L+0.222H
- 4: 0.667L+0.333H
- 5: 0.556L+0.444H
- 6: 0.444H+0.556H
- 7: 0.333L+0.667H
- 8: 0.222L+0.778H
- 9: 0.111L+0.889H
- 10: High (H)

S=11 samples

- 1: Low (L)
- 2: 0.9L+0.1H
- 3: 0.8L+0.2H
- 4: 0.7L+0.3H
- 5: 0.6L+0.4H
- 6: 0.5L+0.5H
- 7: 0.4H+0.6H
- 8: 0.3L+0.7H
- 9: 0.2L+0.8H
- 10: 0.1L+0.9H
- 11: High (H)

Anexo 14. Inserto del calibrador de tiroglobulina

Tg II CalSet

cobas®

REF 06445900 190

→ 4 x 1.0 mL

Español

Uso previsto

Tg II CalSet se emplea para calibrar el test cuantitativo Elecsys Tg II en los inmunoanalizadores Elecsys y cobas e.

Características

Tg II CalSet es un suero equino liofilizado al que se ha añadido tiroglobulina en dos intervalos de concentración.

El CalSet puede combinarse con todos los lotes de reactivos.

Reactivos - Soluciones de trabajo

- Tg II Cal1: 2 frascos, para 1.0 mL de calibrador 1 c/u
 - Tg II Cal2: 2 frascos, para 1.0 mL de calibrador 2 c/u
- Tiroglobulina (humana) en dos intervalos de concentración (aproximadamente 0.15 ng/mL y aproximadamente 180 ng/mL) en una matriz de suero equino.

Analizador cobas e 801: los valores exactos del calibrador específicos del lote están codificados en el código de barras electrónico y disponibles a través de cobas link.

Los demás analizadores: los valores exactos del calibrador específicos del lote se encuentran codificados en el código de barras. Se ponen a disposición impresos en la ficha de código de barras adjunta o bien electrónicamente.

Valores del calibrador

Trazabilidad: El test Elecsys Tg II ha sido estandarizado frente al material de referencia CRM (Certified Reference Material) 457 del BCR (Community Bureau of Reference) de la Unión Europea.¹

Medidas de precaución y advertencias

Producto sanitario para diagnóstico in vitro.

Observe las medidas de precaución habituales para la manipulación de reactivos.

Elimine los residuos según las normas locales vigentes.

Ficha de datos de seguridad a la disposición del usuario profesional que la solicite.

El presente estuche contiene componentes que han sido clasificados por la directiva CE No. 1272/2008 de la siguiente manera:

clorhidrato de 2-metil-2H-isotiazol-3-ona

EUH 208 Puede provocar una reacción alérgica.

Las indicaciones de seguridad del producto corresponden a los criterios del sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (GHS por sus siglas en inglés) válidas en la UE.

Todo el material de origen humano debe considerarse como potencialmente infeccioso. Los hemoderivados han sido preparados exclusivamente con sangre de donantes analizada individualmente y libre de HbSAg y de anticuerpos anti-HCV y anti-HIV. Los métodos analíticos emplearon pruebas aprobadas por la FDA o que cumplen con la Directiva Europea 98/79/CE, Anexo II, Lista A.

Sin embargo, dado que nunca puede excluirse con total seguridad el riesgo de infección, se recomienda tratar este producto con el mismo cuidado que una muestra de paciente. En caso de exposición, proceda según las instrucciones de las autoridades sanitarias competentes.^{2,3}

Evite la formación de espuma en reactivos y muestras de todo tipo (especímenes, calibradores y controles).

Instrucciones de empleo

Para la reconstitución, disolver cuidadosamente el contenido de un frasco añadiendo exactamente 1.0 mL de agua destilada o desionizada y dejar reposar 15 minutos en frasco cerrado. Mezclar con cuidado evitando la formación de espuma.

Transferir los calibradores reconstituidos a los frascos suministrados vacíos, etiquetados y de cierre hermético.

Analizador cobas e 411: Colocar los calibradores reconstituidos en el analizador a 20-25 °C sólo con el objeto de efectuar una calibración. Después del uso, cerrar los frascos tan pronto como sea posible y conservar a 2-8 °C en posición vertical.

Para evitar posibles efectos de evaporación, no deberían efectuarse más de 5 calibraciones por juego de frascos.

Si fuera necesario, congelar en alícuotas; consulte la sección relativa a los analizadores MODULAR ANALYTICS E170, cobas e 601, cobas e 602 y cobas e 801.

Analizadores MODULAR ANALYTICS E170, cobas e 601, cobas e 602 y cobas e 801: Si no se requiere el volumen total para la calibración en los analizadores, trasvasar alícuotas de los calibradores reconstituidos a frascos vacíos de cierre hermético (CalSet Vials). Adherir las etiquetas suministradas a estos frascos adicionales. Conservar las alícuotas que se necesiten más tarde a -20 °C.

Efectuar un solo procedimiento de calibración por alícuota.

Advertencia: las etiquetas de los frascos y las etiquetas adicionales (si están disponibles) contienen 2 códigos de barras diferentes. El código de barras impreso entre las marcas amarillas está destinado exclusivamente al sistema cobas 8000. Si utiliza el sistema cobas 8000, gire la tapa del frasco 180° hacia la posición correcta en la que el código de barras puede ser leído por el sistema. Colocar el frasco en el instrumento de la manera habitual.

Conservación y estabilidad

Conservar a 2-8 °C.

Los calibradores liofilizados permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada.

Estabilidad de los calibradores reconstituidos:	
a -20 °C	93 días (congelar sólo una vez)
o a 2-8 °C	21 días
En el analizador cobas e 411, a 20-25 °C	hasta 5 horas
En los analizadores MODULAR ANALYTICS E170, cobas e 601, cobas e 602 y cobas e 801 a 20-25 °C	emplear una sola vez

Conservar los calibradores en posición vertical a fin de evitar que la solución se adhiera a la tapa hermética.

Material suministrado

- Tg II CalSet, tarjeta de código de barras, ficha de código de barras del calibrador, 4 frascos vacíos y etiquetados de cierre hermético, 2 x 6 etiquetas de frascos

Material requerido (no suministrado)

- REF 11776576322, CalSet Vials, 2 x 56 frascos vacíos de cierre hermético
- Inmunoanalizadores MODULAR ANALYTICS E170 o cobas e y los reactivos del test Elecsys Tg II
- Agua destilada o desionizada

Para otros materiales, véase el manual del operador y la metodología del test.

Realización del test

Colocar los calibradores reconstituidos en frascos compatibles con el sistema y provistos de etiquetas con código de barras en la zona de las muestras.

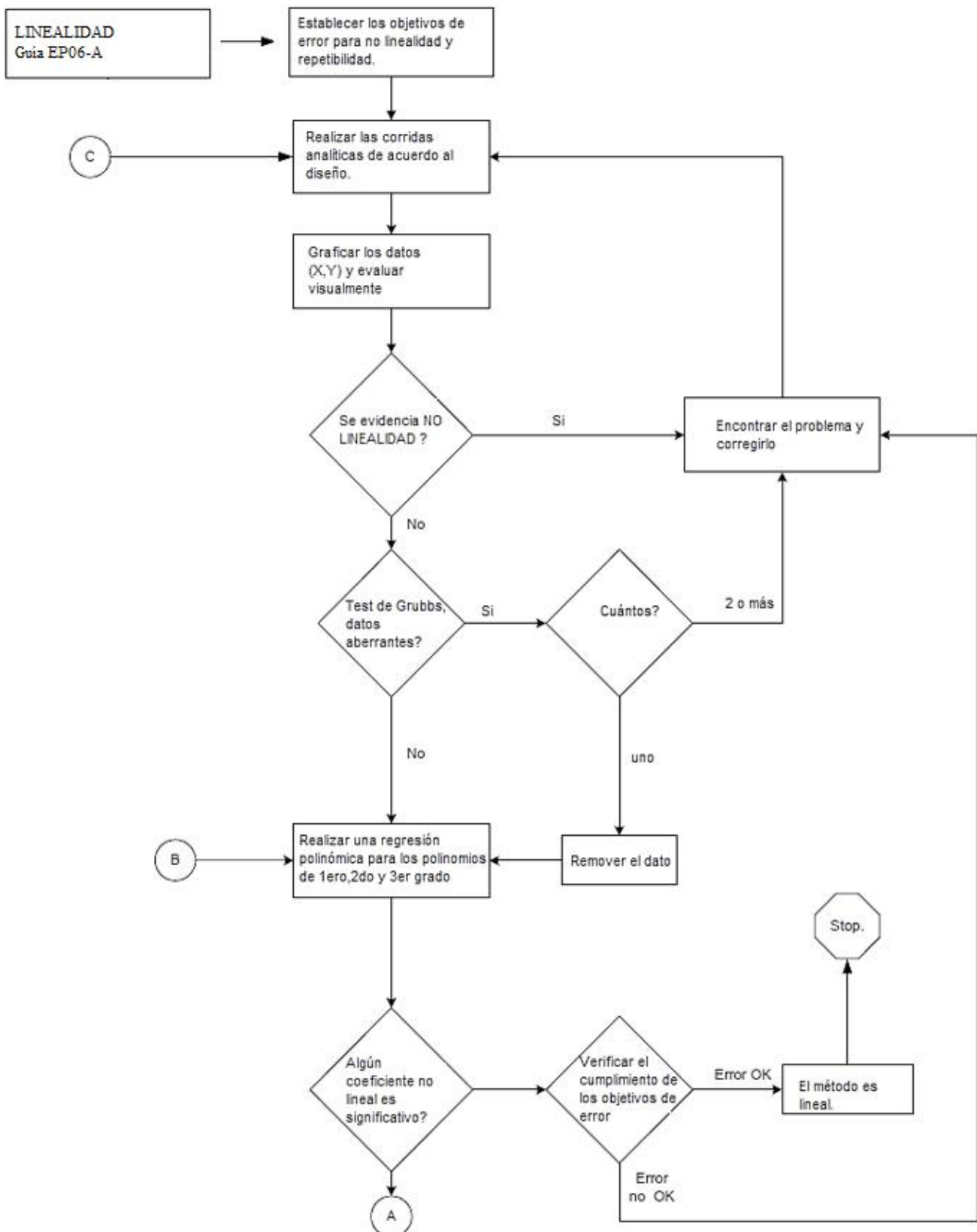
Introducir toda la información necesaria para la calibración del test.

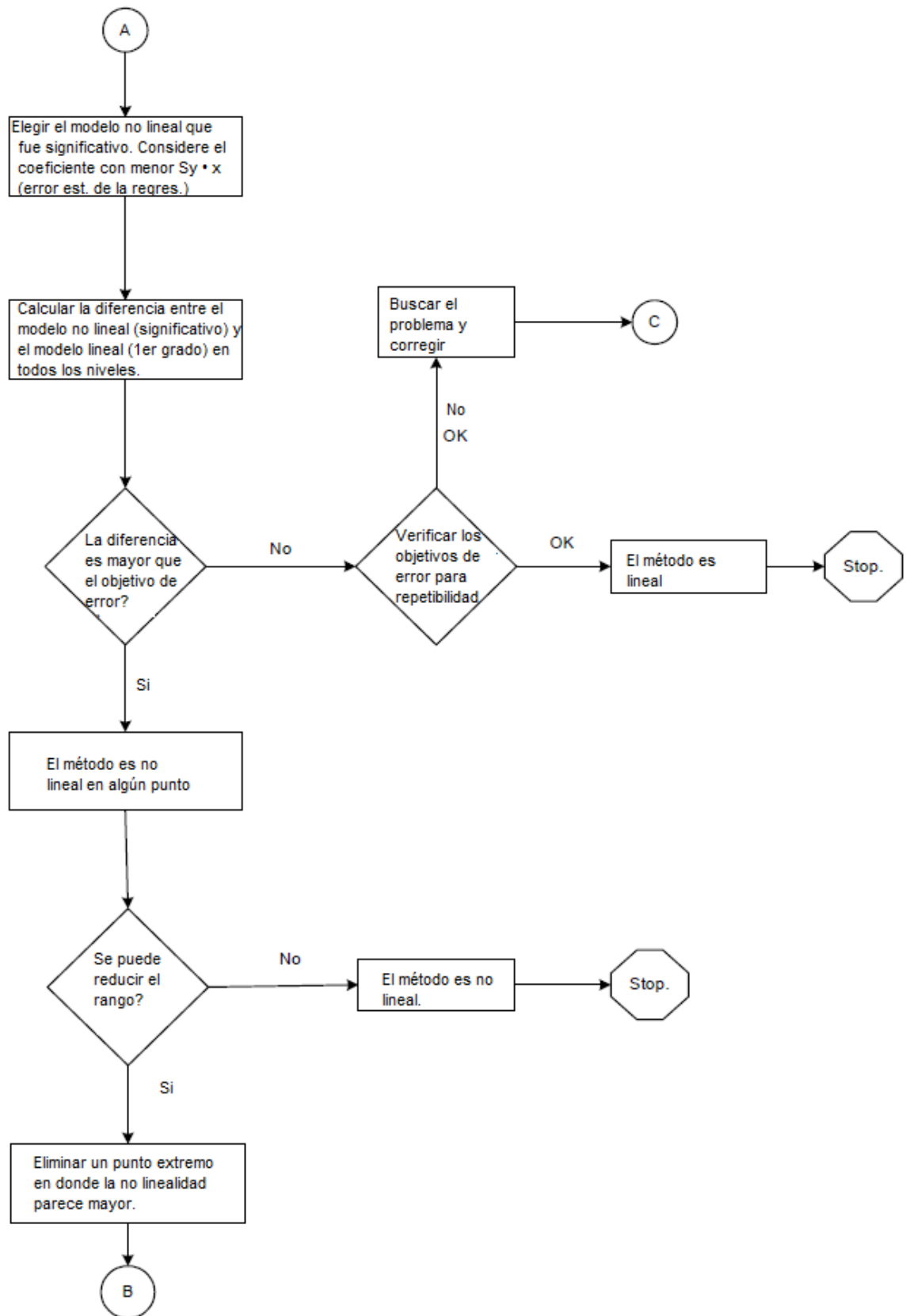
Antes de proceder al análisis, asegúrese de que los calibradores tengan una temperatura de 20-25 °C.

Referencias bibliográficas

- Feldt-Rasmussen U, Profils C, Colinet E, et al. Purification and assessment of stability and homogeneity of human thyroglobulin reference material (CRM 457). Exp Clin Endocrinol 1994;102:87-91.
- Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne pathogens. (29 CFR Part 1910.1030). Fed. Register.
- Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.

Anexo 15. Diagrama de flujo para determinar la linealidad según guía EP06- A





Anexo 16. Determinación de los grados de libertad.

Table 6. df_{WL} as a Function of the Claims Ratio ($\rho = \sigma_{WL} / \sigma_R$), for Five to Seven Runs, Five Replicates per Run

5 Runs		6 Runs		7 Runs	
ρ	df_{WL}	ρ	df_{WL}	ρ	df_{WL}
2.74	5	3.02	6	3.27	7
2.06	6	2.25	7	2.42	8
1.78	7	1.93	8	2.06	9
1.62	8	1.74	9	1.85	10
1.51	9	1.62	10	1.71	11
1.43	10	1.52	11	1.61	12
1.37	11	1.46	12	1.54	13
1.32	12	1.40	13	1.48	14
1.28	13	1.35	14	1.42	15
1.24	14	1.32	15	1.38	16
1.21	15	1.28	16	1.35	17
1.19	16	1.25	17	1.31	18
1.16	17	1.23	18	1.29	19
1.14	18	1.20	19	1.26	20
1.12	19	1.18	20	1.24	21
1.10	20	1.16	21	1.22	22
1.08	21	1.14	22	1.20	23
1.05	22	1.12	23	1.18	24
1.03	23	1.11	24	1.16	25
1.00	24	1.09	25	1.14	26
		1.07	26	1.13	27
		1.05	27	1.11	28
		1.03	28	1.10	29
		1.00	29	1.08	30
				1.07	31
				1.05	32
				1.03	33
				1.00	34

Abbreviations: σ_R , manufacturer's claim for repeatability; σ_{WL} , manufacturer's claim for within-laboratory imprecision; df_{WL} , degrees of freedom for within-laboratory imprecision.

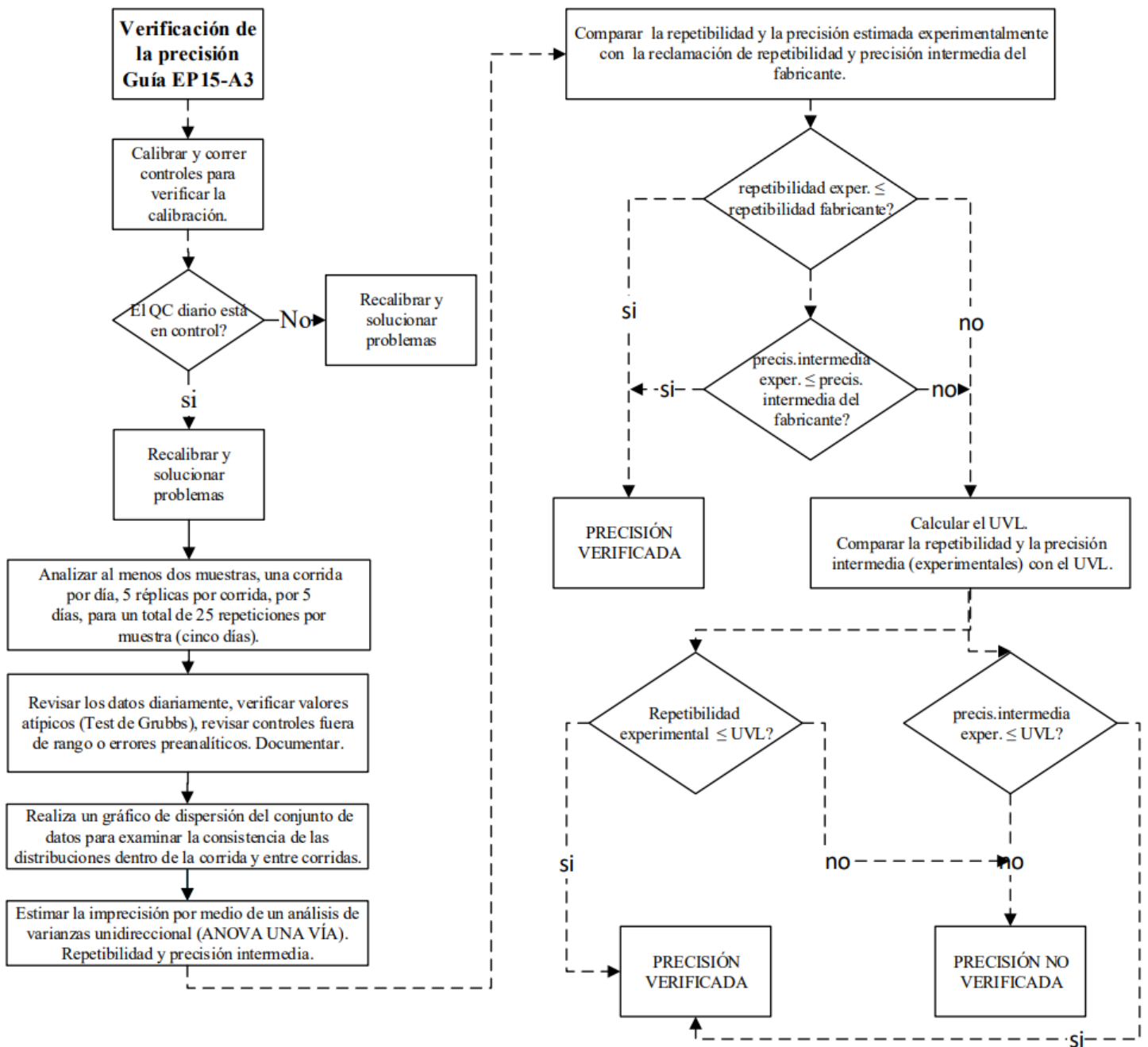
Anexo 17. *Determinación del factor F para el cálculo del UVL utilizando (df_R) y (df_{WL})*

Table 7. UVL Factors (F) as a Function of DF and Number of Samples (One to Six) in the Experiment

DF	Number of Samples					
	1	2	3	4	5	6
5	1.49	1.60	1.66	1.71	1.74	1.76
6	1.45	1.55	1.61	1.65	1.67	1.70
7	1.42	1.51	1.56	1.60	1.62	1.65
8	1.39	1.48	1.53	1.56	1.58	1.60
9	1.37	1.45	1.50	1.53	1.55	1.57
10	1.35	1.43	1.47	1.50	1.52	1.54
11	1.34	1.41	1.45	1.48	1.50	1.52
12	1.32	1.39	1.43	1.46	1.48	1.49
13	1.31	1.38	1.42	1.44	1.46	1.47
14	1.30	1.37	1.40	1.42	1.44	1.46
15	1.29	1.35	1.39	1.41	1.43	1.44
16	1.28	1.34	1.38	1.40	1.41	1.43
17	1.27	1.33	1.36	1.39	1.40	1.41
18	1.27	1.32	1.35	1.37	1.39	1.40
19	1.26	1.31	1.34	1.36	1.38	1.39
20	1.25	1.31	1.34	1.36	1.37	1.38
21	1.25	1.30	1.33	1.35	1.36	1.37
22	1.24	1.29	1.32	1.34	1.35	1.36
23	1.24	1.29	1.31	1.33	1.35	1.36
24	1.23	1.28	1.31	1.32	1.34	1.35
25	1.23	1.28	1.30	1.32	1.33	1.34
26	1.22	1.27	1.30	1.31	1.32	1.34
27	1.22	1.26	1.29	1.31	1.32	1.33
28	1.22	1.26	1.28	1.30	1.31	1.32
29	1.21	1.26	1.28	1.30	1.31	1.32
30	1.21	1.25	1.27	1.29	1.30	1.31
31	1.20	1.25	1.27	1.29	1.30	1.31
32	1.20	1.24	1.27	1.28	1.29	1.30
33	1.20	1.24	1.26	1.28	1.29	1.30
34	1.20	1.24	1.26	1.27	1.28	1.29

Abbreviations: DF, degrees of freedom; UVL, upper verification limit.

Anexo 18. Diagrama de flujo de la estimación de la precisión



Anexo 19. Reporte Unity para Tiroglobulina. Grupo Par

Unity™ Manufacturer Report for Roche
Immunoassay Plus • Lot 40340 • Exp 30–Nov–2019

August 2018
Conventional Units

Testosterone Electrochemiluminescence (ECL) ng/mL									
Level	Mon	Cum	Level	Mon	Cum	Level	Mon	Cum	
Roche Elecsys / cobas e 411 Series									
Mean	1 2.03	2.04	2 5.59	5.55	3 9.18	9.05			
SD	1 0.132	0.133	2 0.320	0.345	3 0.592	0.635			
CV	1 6.5	6.5	2 5.7	6.2	3 6.5	7.0			
# Points	1 306	3065	2 313	3733	3 239	3426			
# Labs	1 38	75	2 35	72	3 34	60			
Roche Hitachi/MODULAR									
Mean	1 2.12	2.08	2 5.81	5.76	3 --	8.42			
SD	1 0.052	0.106	2 0.156	0.248	3 --	0.716			
CV	1 2.4	5.1	2 2.7	4.3	3 --	8.5			
# Points	1 58	756	2 57	739	3 --	332			
# Labs	1 2	5	2 2	5	3 --	3			
Theophylline Fluorescence Polarization–Roche µg/mL									
Level	Mon	Cum	Level	Mon	Cum	Level	Mon	Cum	
Roche cobas 6000/8000/c 311									
Mean	1 --	4.56	2 --	14.69	3 --	28.00			
SD	1 --	0.174	2 --	0.531	3 --	1.03			
CV	1 --	3.8	2 --	3.6	3 --	3.7			
# Points	1 --	8543	2 --	531	3 --	642			
# Labs	1 --	1	2 --	1	3 --	1			
Roche cobas Integra / c 111									
Mean	1 --	4.48	2 --	14.49	3 --	27.53			
SD	1 --	0.166	2 --	0.880	3 --	0.624			
CV	1 --	3.7	2 --	6.1	3 --	2.3			
# Points	1 --	7	2 --	9	3 --	6			
# Labs	1 --	1	2 --	1	3 --	1			
Theophylline KIMS (Roche) µg/mL									
Level	Mon	Cum	Level	Mon	Cum	Level	Mon	Cum	
Roche cobas 6000/8000/c 311									
Mean	1 4.24	4.54	2 13.93	14.20	3 25.90	26.98			
SD	1 0.210	0.198	2 0.486	0.644	3 0.810	1.31			
CV	1 5.0	4.4	2 3.5	4.5	3 3.1	4.9			
# Points	1 83	9375	2 85	1349	3 85	1432			
# Labs	1 3	10	2 3	12	3 4	9			
Roche Hitachi/MODULAR									
Mean	1 4.47	4.20	2 14.62	14.05	3 26.79	26.63			
SD	1 0.280	0.341	2 0.590	0.645	3 1.09	1.10			
CV	1 6.3	8.1	2 4.0	4.6	3 4.1	4.1			
# Points	1 22	196	2 22	190	3 21	190			
# Labs	1 1	1	2 1	1	3 1	1			
Thyroglobulin Electrochemiluminescence (ECL) ng/mL									
Level	Mon	Cum	Level	Mon	Cum	Level	Mon	Cum	
Roche cobas 6000/8000/c 311									
Mean	1 6.93	7.00	2 7.96	8.07	3 7.67	7.85			
SD	1 0.543	0.459	2 0.648	0.578	3 0.428	0.452			
CV	1 7.8	6.6	2 8.1	7.2	3 5.6	5.8			
# Points	1 274	2768	2 209	2277	3 190	2080			
# Labs	1 20	34	2 17	31	3 15	27			
Roche cobas 6000/8000/c 311 • 2nd Generation									
Mean	1 7.74	7.46	2 8.62	8.41	3 --	--			
SD	1 0.197	0.361	2 0.221	0.438	3 --	--			
CV	1 2.5	4.8	2 2.6	5.2	3 --	--			
# Points	1 8	431	2 8	431	3 --	--			
# Labs	1 2	2	2 2	2	3 --	--			
Roche Elecsys / cobas e 411 Series									
Mean	1 7.29	7.14	2 8.36	8.20	3 8.19	7.94			
SD	1 0.563	0.604	2 0.655	0.569	3 0.564	0.719			
CV	1 7.7	8.5	2 7.8	6.9	3 6.9	9.0			
# Points	1 73	580	2 49	477	3 45	418			
# Labs	1 7	20	2 5	18	3 4	14			

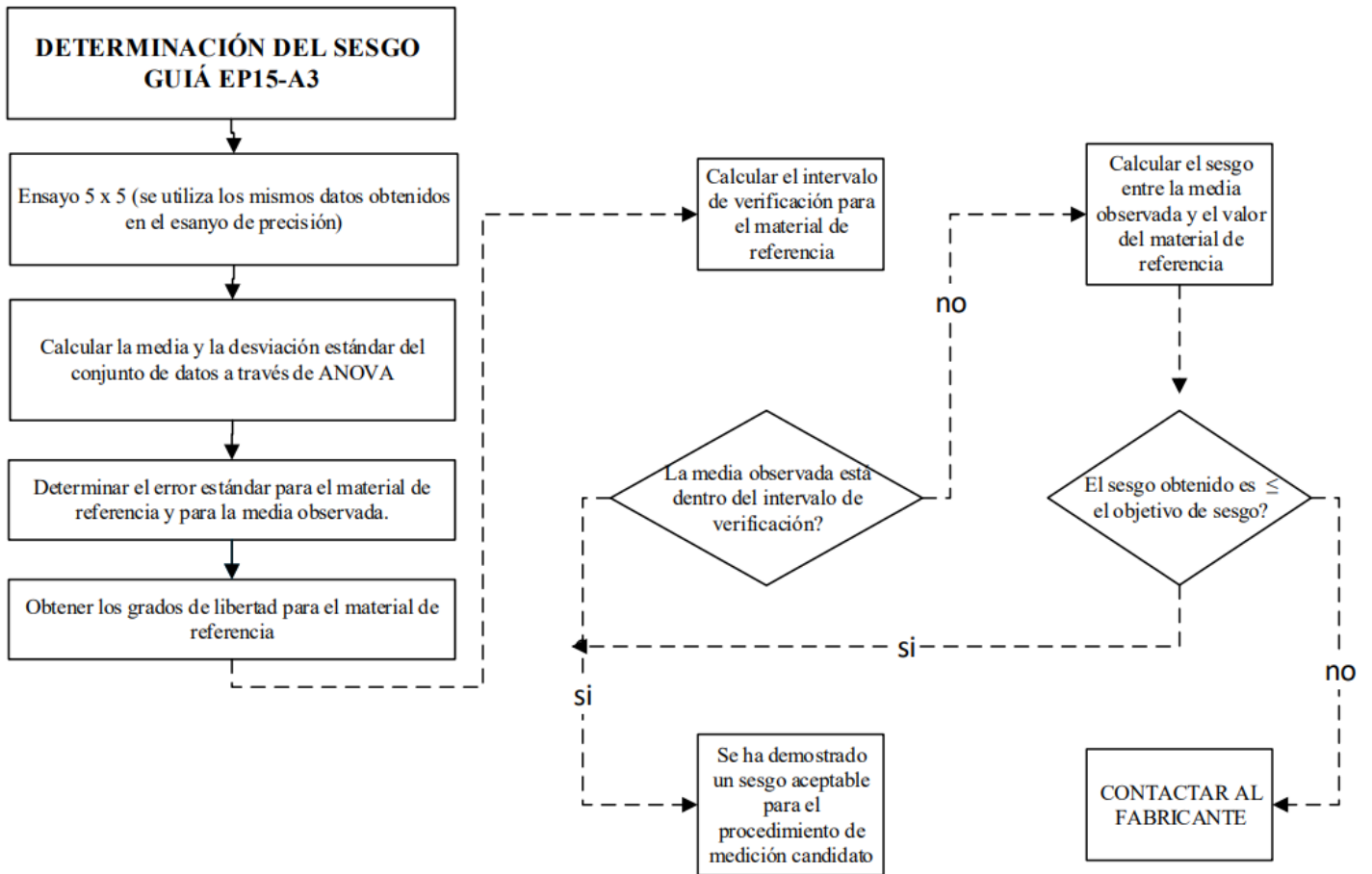
Anexo 20. Cálculo de los grados de libertad combinados

Table 15A. df_c for the Combined Standard Error of the Mean and TV as a Function of the Ratio of the Standard Error of the Reference Material to the Standard Error of the Mean ($\tau = se_{RM}/se_{\bar{x}}$), for Five Runs, With Five Replicates per Run, and $N_{RM} = 10, 20, 50, 100,$ and ≥ 200 Laboratories. NOTE: Table 15A is intended for use in Scenarios B (PT) and C (peer group QC) in Section 3.3, when the user’s experiment involves five runs.

10 Laboratories		20 Laboratories		50 Laboratories		100 Laboratories		200 Laboratories	
τ	df_c	τ	df_c	τ	df_c	τ	df_c	τ	df_c
0.000	4	0.000	4	0.000	4	0.000	4	0.000	4
0.349	5	0.346	5	0.344	5	0.344	5	0.344	5
0.490	6	0.481	6	0.477	6	0.475	6	0.475	6
0.600	7	0.582	7	0.573	7	0.571	7	0.569	7
0.698	8	0.666	8	0.652	8	0.647	8	0.646	8
0.791	9	0.739	9	0.718	9	0.713	9	0.710	9
0.886	10	0.806	10	0.778	10	0.770	10	0.766	10
0.991	11	0.869	11	0.831	11	0.821	11	0.816	11
1.126	12	0.929	12	0.880	12	0.867	12	0.861	12
1.500	13	0.987	13	0.925	13	0.910	13	0.903	13
2.175	12	1.045	14	0.968	14	0.949	14	0.941	14
2.832	11	1.104	15	1.008	15	0.987	15	0.977	15
4.149	10	1.164	16	1.047	16	1.022	16	1.010	16
		1.227	17	1.084	17	1.055	17	1.042	17
		1.295	18	1.119	18	1.086	18	1.072	18
		1.369	19	1.154	19	1.117	19	1.101	19
		1.455	20	1.188	20	1.146	20	1.128	20
		1.561	21	1.221	21	1.174	21	1.154	21
		1.711	22	1.253	22	1.201	22	1.179	22
		2.179	23	1.285	23	1.227	23	1.203	23
		3.121	22	1.317	24	1.252	24	1.227	24
		4.070	21	1.348	25	1.277	25	1.249	25
		5.990	20	1.379	26	1.301	26	1.271	26
				1.410	27	1.325	27	1.292	27
				1.441	28	1.348	28	1.313	28
				1.472	29	1.370	29	1.333	29
				1.503	30	1.393	30	1.352	30
				1.850	40	1.598	40	1.527	40
				3.500	53	1.985	60	1.808	60
						4.975	103	2.528	120
								7.053	203
infinity	9	infinity	19	infinity	49	infinity	99	infinity	199

Abbreviations: df_c , combined degrees of freedom; PT, proficiency testing; QC, quality control; TV, target value.

Anexo 21 Diagrama de flujo de la estimación del sesgo



Anexo 22 Resultados individuales de la regresión polinómica. 11 niveles.

Tabla 1

Coefficientes de la regresión modelo lineal programa SPSS.

Coeficientes					
	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados		Sig.
	B	Error estándar	Beta	t	
b ₁	2,935	0,047	0,998	62,321	0,000
b ₀	-3,717	0,335		-11,107	0,000

Elaborado por: (Suasnavas C.)

Tabla 2

Coefficientes de la regresión modelo cuadrático programa SPSS

Coeficientes					
	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados		Sig.
	B	Error estándar	Beta	t	
b ₁	3,237	0,242	1,100	13,351	0,000
b ₂ coeficiente no lineal	-0,023	0,018	-0,105	-1,270	0,221
b ₀	-4,507	0,704		-6,402	0,000

Elaborado por: (Suasnavas C.)

Tabla 3

Coefficientes de la regresión modelo grado 3 (cúbico) programa SPSS.

Coeficientes					
	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados		Sig.
	B	Error estándar	Beta	t	
b ₁	1,998	0,851	0,679	2,349	0,032
b ₂ coeficiente no lineal	0,192	0,143	0,865	1,341	0,199
b ₃ coeficiente no lineal	-0,011	0,007	-0,563	-1,514	0,149
b ₀	-2,525	1,474		-1,712	0,106

Elaborado por: (Suasnavas C.)

Anexo 23 Resultados individuales de la regresión polinómica. 5 niveles

Tabla 1

Coefficientes de la regresión modelo lineal programa SPSS 5 diluciones

Coeficientes					
	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
	B	Desy. Error	Beta		
b ₁	,287	,006	,998	47,599	,000
b ₀	-,273	,020		-13,641	,000

Elaborado por: (Suasnavas C.)

Tabla 2

Coefficientes de la regresión modelo cuadrático programa SPSS 5 diluciones

Coeficientes					
	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
	B	Desy. Error	Beta		
b ₁	,251	,030	,874	8,280	,000
b _{2no lineal}	,006	,005	,126	1,195	,271
b ₀	-,231	,040		-5,804	,001

Elaborado por: (Suasnavas C.)

Tabla 3

Coefficientes de la regresión modelo cúbico programa SPSS 5 diluciones

Coeficientes					
	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
	B	Desy. Error	Beta		
b ₁	-,012	,065	-,043	-,191	,855
b _{2no lineal}	,106	,024	2,266	4,406	,005
b _{3no lineal}	-,011	,003	-1,253	-4,187	,006
b ₀	-,043	,050		-,872	,417

Elaborado por: (Suasnavas C.)

Anexo 24 Los resultados individuales del ANOVA de una vía para la muestra 1.2 ng/mL y 7 ng/mL

Tabla 1
ANOVA UNA VÍA. Muestra 1.2 ng/mL

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig
Entre grupos (MS1)	0.228	4	0.057	46.946	0.000
Dentro de grupos (MS2)	0.024	20	0.001		
Total	0.253	24			

Elaborado por: (Suasnavas C.)

Tabla 2
ANOVA UNA VÍA. Muestra 7 ng/mL

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos (MS1)	3,960	4	0,990	30,089	0,000
Dentro de grupos (MS2)	0,592	18	0,033		
Total	4,552	22			

Elaborado por: (Suasnavas C.)