

Verificando el Desempeño de Métodos Analíticos: Pasos a Seguir para Verificar las Especificaciones de los Fabricantes Métodos cuantitativos y cualitativos

Veronica I. Luzzi, PhD, D(ABCC)
Grupo Latinoamericano de Trabajo del ADLM
TRICORE LABORATORIES
Jefa de sección y directora médica



Temas a tratar (1^{ra} Sesión)

- Impacto clínico de verificación de métodos
- Lista de guías CLSI
- Validación
- Verificación:
 - Precisión
 - Rango analítico de medición





ACCIÓN

PRESCRIPCIÓN

INTERPRETACIÓN

TOMA DE LA
MUESTRA

INFORME

IDENTIFICACIÓN

ANÁLISIS

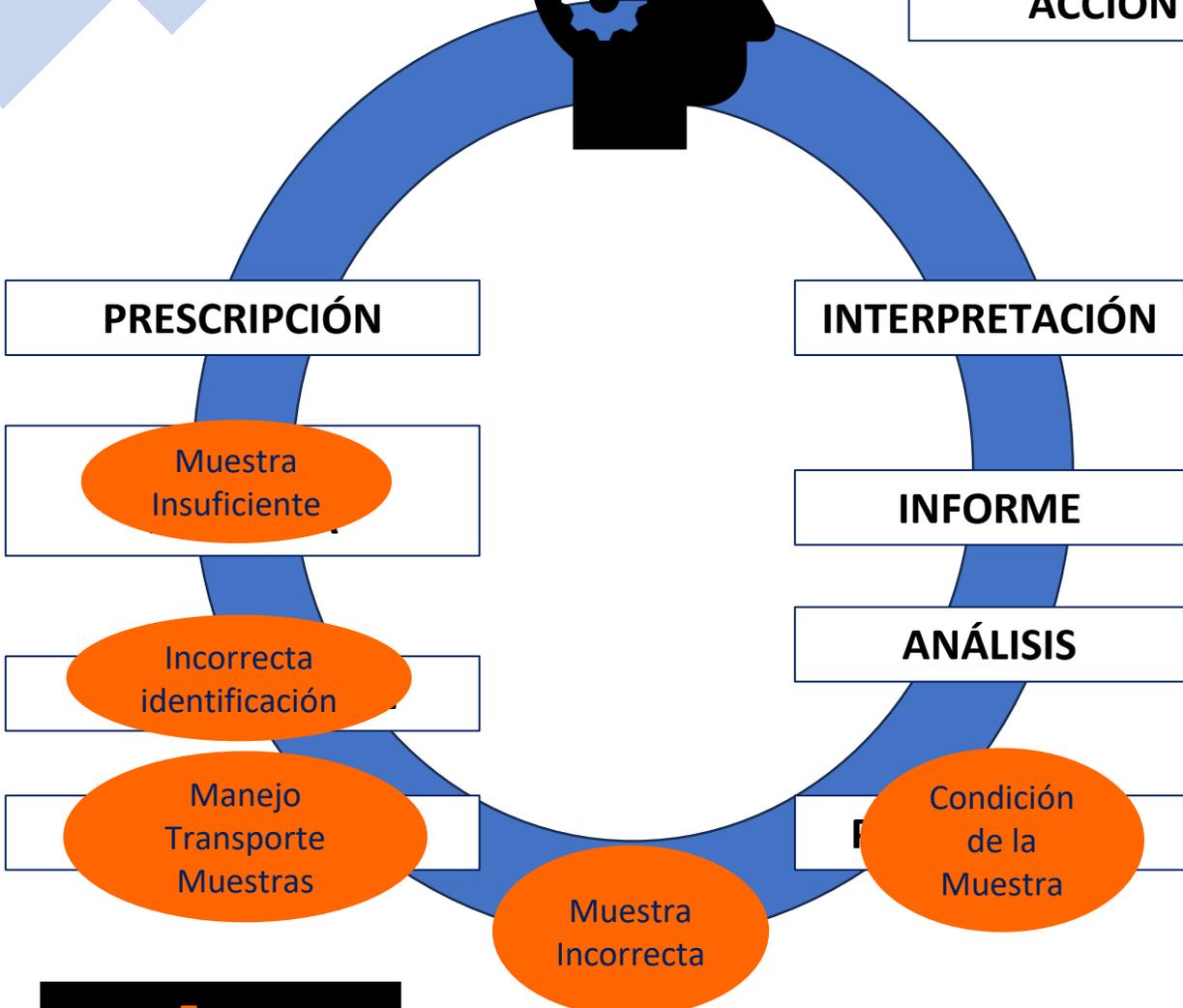
TRANSPORTE

PREPARACIÓN

- En cada análisis de laboratorio que realizamos, hay alguien que depende de ese resultado y sólo asegurando la calidad del mismo, lograremos que este resultado sea clínicamente útil; en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del paciente”
- (Cerca del 60-70% de estas decisiones clínicas están basadas en resultados de laboratorio)



ACCIÓN



Fase Pre Analítica (46-68.2%)

Fase Post Analítica (18.5-47%)

Fase Analítica (7-13%)

Tiempos entrega

Reporte

Ingreso de datos

Interferencias

Ensayo fuera de control

Malfuncionamiento de equipos

Ensayo no verificado: Segado Impreciso

Elementos de la Calidad Analítica

El uso de esta Triada de los elementos de la calidad analítica garantiza la calidad, relevancia médica y utilidad clínica de las pruebas de laboratorio.



Hyltoft Petersen y col. Clin Chem Lab Med 2012;50(5):819–831 y Hyltoft Petersen y col. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1996; 34: 983-999



Documentos CLSI para evaluación del desempeño analítico de un método

| Documento | Criterio Desempeño |
|---|--|
| EP15- Verificación del desempeño de precisión y estimación del sesgo por el usuario | Precisión y Sesgo |
| EP9- Comparación de métodos y estimación del sesgo utilizando muestras de pacientes | Comparación métodos (sesgo) |
| EP6-Evaluación de la Linealidad en Procedimientos de medida cuantitativos | Linealidad (Rango de medición analítico) |
| EP 28-Como definir y determinar los intervalos de referencia en el Laboratorio | Intervalos de referencia |
| EP 12: Evaluación cualitativa del desempeño | Límite de detección |

Nichols J. Advances in Clinical Chemistry.2009, Vol 47:121-137



Evaluación Inicial del Desempeño Analítico

*Evaluación inicial
de desempeño*



*Validación
analítica*

versus



*Verificación
analítica*



§493.1250, Sistemas Analíticos

§493.1253 Establecimiento y verificación de las especificaciones de desempeño del método:

Verificación de las especificaciones de desempeño. Cada laboratorio que introduce un sistema de examen no modificado, aprobado o autorizado por la FDA, debe seguir lo siguiente antes de reportar los resultados de exámenes de los pacientes:

(i) Demostrar que puede obtener especificaciones de desempeño comparables a aquellas establecidas por el fabricante para las siguientes características de desempeño:

(A) *Exactitud.* (B) *Precisión.* (C) *Rango reportable de los resultados*

(ii) Verificar que los límites de referencia del fabricante (intervalos de referencia) son apropiados para la población de pacientes del laboratorio

La filosofía del CAP es que todos los exámenes de los laboratorios clínicos necesitan cumplir los requisitos definidos bajo la sección §493.1253 (b) de CLIA '88, para cada procedimiento de examen:

La lista de verificación GEN antes 2011 y COM después 2011 al 2013 del CAP incluye:

- Requisitos de especificación de desempeño — exactitud y precisión (GEN:42020/COM.40300)
- Rango reportable (GEN:42085/COM.40600)
- Intervalo de referencia (GEN:42162/COM.50000)
- Sensibilidad o límite de detección inferior (GEN:42025/COM.40400)
- Especificidad Analítica (interferencias) (COM.40500)

<http://www.cms.gov/clia/>

CAP



ISO 15189

| | |
|----------------|---|
| 5.5 | Examination processes |
| 5.5.1 | Selection, verification and validation of examination procedures |
| 5.5.1.1 | General The laboratory shall select examination procedures which have been validated for their intended use. The identity of persons performing activities in examination processes shall be recorded. The specified requirements (performance specifications) for each examination procedure shall relate to the intended use of that examination. <i>NOTE Preferred procedures are those specified in the instructions for use of in vitro medical devices or those that have been published in established/authoritative textbooks, peer-reviewed texts or journals, or in international consensus standards or guidelines, or national or regional regulations.</i> |

| | |
|----------------|--|
| 5.5.1.2 | Verification of examination procedures Validated examination procedures used without modification shall be subject to independent verification by the laboratory before being introduced into routine use. The laboratory shall obtain information from the manufacturer/method developer for confirming the performance characteristics of the procedure. The independent verification by the laboratory shall confirm, through obtaining objective evidence (in the form of performance characteristics) that the performance claims for the examination procedure have been met. The performance claims for the examination procedure confirmed during the verification process shall be those relevant to the intended use of the examination results. The laboratory shall document the procedure used for the verification and record the results obtained. Staff with the appropriate authority shall review the verification results and record the review. |
|----------------|--|

| | |
|----------------|--|
| 5.5.1.3 | Validation of examination procedures The laboratory shall validate examination procedures derived from the following sources: a) non-standard methods; b) laboratory designed or developed methods; c) standard methods used outside their intended scope; d) validated methods subsequently modified. The validation shall be as extensive as is necessary and confirm, through the provision of objective evidence (in the form of performance characteristics), that the specific requirements for the intended use of the examination have been fulfilled. <i>NOTE Performance characteristics of an examination procedure should include consideration of: measurement trueness, measurement accuracy, measurement precision including measurement repeatability and measurement intermediate precision; measurement uncertainty, analytical specificity, including interfering substances, analytical sensitivity, detection limit and quantitation limit, measuring interval, diagnostic specificity and diagnostic sensitivity.</i> The laboratory shall document the procedure used for the validation and record the results obtained. Staff with the authority shall review the validation results and record the review. When changes are made to a validated examination procedure, the influence of such changes shall be documented and, when appropriate, a new validation shall be carried out. |
|----------------|--|

Validación

Verificación

Validación

Verificación

Evaluación del desempeño analítico

Validación de un método = **establecimiento** *del desempeño analítico* de un método o de un nuevo método diagnóstico.

internamente desarrollado

modificado por el fabricante o el Laboratorio



Evaluación del desempeño analítico

**COM.40350 Validation of Test Performance Specifications - Modified FDA-cleared/
approved Tests and LDTs**

Phase II



Prior to clinical use of each modified FDA-cleared or approved test and laboratory-developed tests (LDTs), the laboratory has performed a validation study and prepared a written assessment of each of the following test method performance specifications, as applicable, using a sufficient number of characterized samples:

- Analytical accuracy
- Analytical precision
- Reportable range
- Analytical sensitivity (lower detection limit)
- Analytical specificity
- Any other performance characteristic required to ensure analytical test performance



Verificación del desempeño analítico

Verificación de un método = proceso que determina si se cumplen el desempeño de un método previamente establecido y aprobado por un ente regulatorio.

verificación del desempeño:

- precisión
- exactitud
- linealidad
- intervalo de referencia (en otra ocasión)

Nichols J. Advances in Clinical Chemistry.2009, Vol 47:121-137
Theodorsson ,E. Bioanalysis (2012) 4(3), 305–320



Precisión

- Grado de concordancia entre valores de mediciones cuantitativas obtenidos cuando se realizan mediciones repetidas en una misma muestra en condiciones específicas
- Nivel de reproducibilidad en una serie de repeticiones



Precisión

- No se representa típicamente como un valor numérico
- Se mide y se expresa en términos de **imprecisión:**

- **Desviación Estándar (DS)**

- Raíz cuadrada de la varianza

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(N - 1)}}$$

- **Coeficiente de Variación (CV)**

- SD como porcentaje de la media

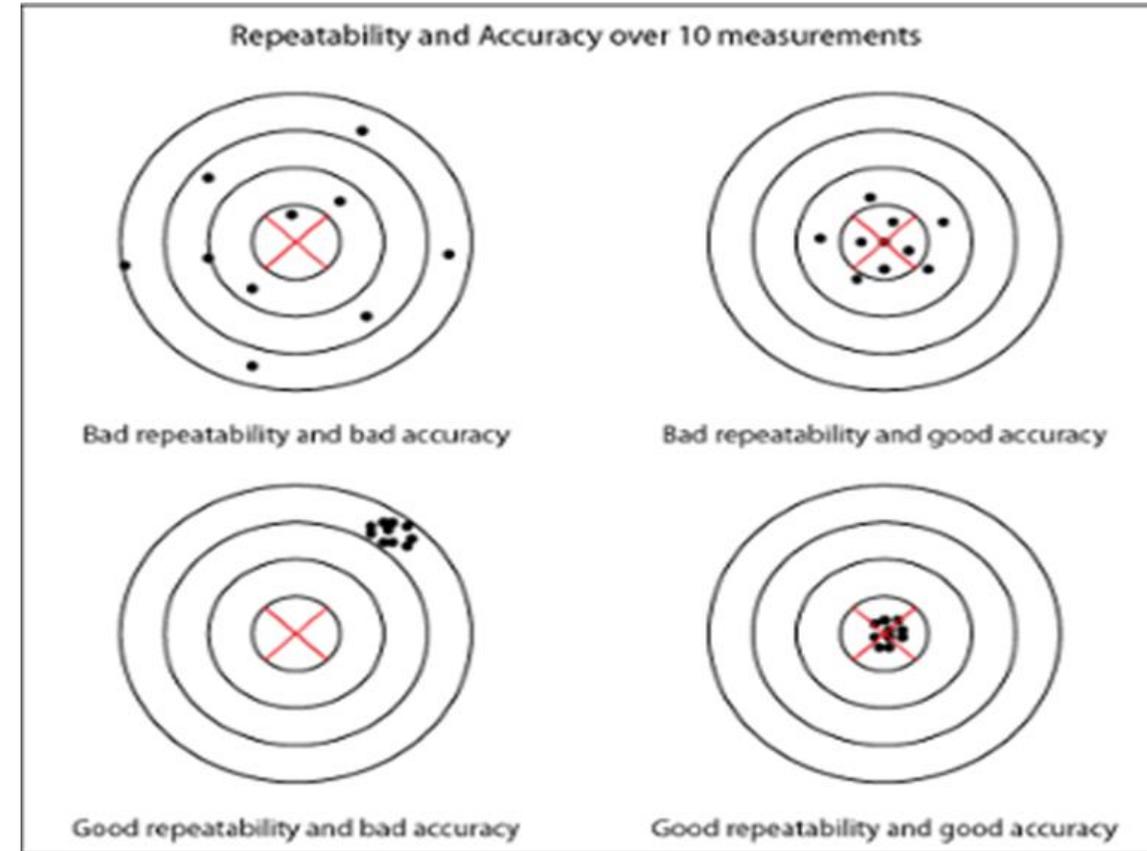
$$\% CV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$



Experimentos de precisión

Para estimar la imprecisión o el error aleatorio del método = dispersión de los valores obtenidos

Observar la variación esperada en un resultado bajo las condiciones normales de operación del laboratorio





CLINICAL AND
LABORATORY
STANDARDS
INSTITUTE®

September 2014

EP15-A3

User Verification of Precision and Estimation of Bias; Approved Guideline—Third Edition

Nos ayuda a verificar las especificaciones de precisión del fabricante, establecidas en una validación utilizando la guía EP5-A3



Verificación de la Precisión – EP15-A3

- Protocolo reducido
- Diseñado para minimizar costos y maximizar la evaluación adecuada del método
- Un solo experimento sirve para estimar
 - Repetibilidad (Precisión Intracorrida)
 - Precisión Intralaboratorio (Imprecisión Total)
- Ventajas
 - Eficiencia
 - Rigurosidad de los recursos informáticos
 - Robustez de los cálculos

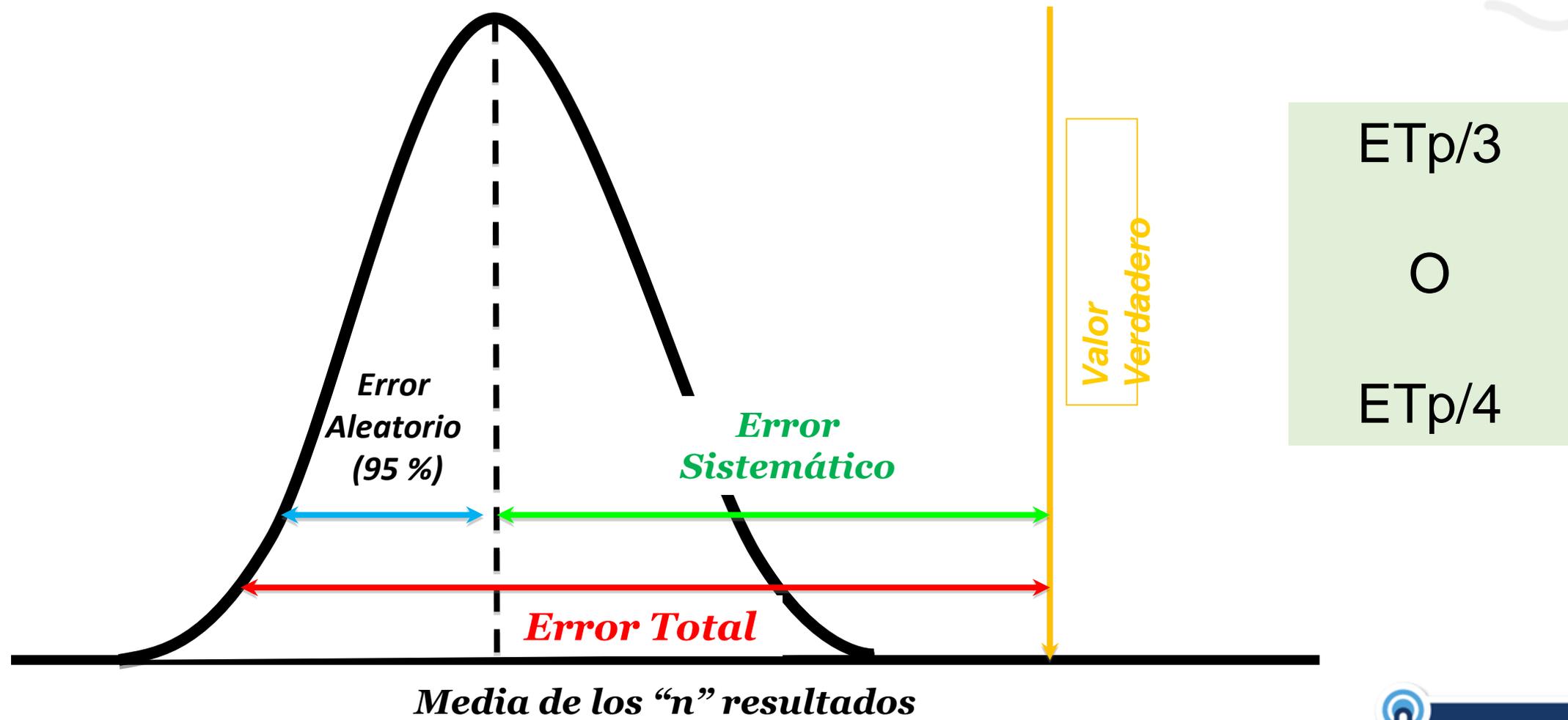


Nomenclatura EP15-A3

| Tipo de precisión | Especificaciones del Fabricante | Cálculos estimados por el usuario |
|------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Repetibilidad | σ_R | S_R |
| Imprecisión Intralaboratorio | σ_{WL} | S_{WL} |



Error Total permitido (allowable) = ETp o ETA



1. Error total permitido = ETA

Requisitos de calidad analítica de CLIA

| Prueba o analito | Desempeño aceptable |
|------------------|--|
| Ácido úrico | Valor target $\pm 17\%$ |
| Colesterol total | Valor target $\pm 10\%$ |
| Calcio total | Valor target $\pm 1,0$ mg/dL |
| Creatinina | Valor target ± 0.3 mg/dL o $\pm 15\%$ (el mayor) |
| Glucosa | Valor target ± 6 mg/dL o $\pm 10\%$ |



2. Niveles de decisión clínica

3. DS máxima aceptable

ET_p/3

0

ET_p/4

| Analito | Criterios CLIA %ET _p | Nivel de decisión clínica | Error total | Máxima SD (ET/3 o 4) |
|----------------|---------------------------------|---------------------------|-------------|----------------------|
| Glucosa | ± 6 mg/dL | 50 mg/dL | 6 mg/dL | 2 o 1,5 mg/dL |
| | 0 | 126 mg/dL | 12,6 mg/dL | 4,2 o 3,2 mg/dL |
| | ± 10% | 200 mg/dL | 20 mg/dL | 6,7 o 5 mg/dL |

4. Especificaciones del fabricante



Repetibilidad máxima observada

Las desviaciones estándar máximas que se esperan en función de los datos recogidos para la repetibilidad (precisión intraserie) utilizando 5 duplicados en las siguientes concentraciones de glucosa son:

| Concentración de GLU | DE máxima aceptable |
|-------------------------|--------------------------|
| 75 mg/dL [4.16 mmol/L] | 5.6 mg/dL [0.31 mmol/L] |
| 375 mg/dL [20.8 mmol/L] | 17.8 mg/dL [0.99 mmol/L] |

Es posible que el sistema no funcione correctamente si se excede la DE máxima aceptable.

Características específicas de funcionamiento

Los siguientes datos representan el rendimiento típico del Sistema Dimension Vista®.

| Material | Precisión ^{9, e} | |
|-----------------------------|---------------------------|--|
| | Media mg/dL [mmol/L] | Desviación estándar (%CV) Repetibilidad Intralab |
| Suero | | |
| Control Multiquel® | | |
| Nivel 1 | 75 [4.16] | 1 [0.07] (2) 2 [0.12] (3) |
| Nivel 2 | 379 [21.03] | 4 [0.24] (1) 8 [0.46] (2) |
| Orina | | |
| Control de orina Liquichek™ | | |
| Nivel 1 | 31 [1.72] | 1 [0.06] (3) 1 [0.07] (4) |
| Nivel 2 | 284 [15.76] | 10 [0.54] (3) 11 [0.63] (4) |
| LCR | | |
| Control de LCR Liquichek™ | | |
| Nivel 1 | 58 [3.22] | 2 [0.14] (4) 3 [0.17] (5) |
| Nivel 2 | 28 [1.55] | 1 [0.06] (3) 1 [0.06] (4) |

e. Se utilizó CLSI/NCCLS EP5-A2. Durante 20 días, se analizaron cada día dos ensayos independientes, con dos muestras de prueba para cada material de prueba.

Multiquel® es una marca comercial registrada y Liquichek™ una marca comercial de Bio-Rad Laboratories, Irvine, CA, 92618, USA.

Repetibilidad máxima observada

Las desviaciones estándar máximas que se esperan en función de los datos recogidos para la repetibilidad (precisión intraserie) utilizando 5 duplicados en las siguientes concentraciones de glucosa son:

Concentración de GLU

75 mg/dL [4.16 mmol/L]

375 mg/dL [20.8 mmol/L]

DE máxima aceptable

5.6 mg/dL [0.31 mmol/L]

17.8 mg/dL [0.99 mmol/L]

Es posible que el sistema no funcione correctamente si se excede la DE máxima aceptable.

Para el Nivel 1
Media = 75 mg/dL
DE= 5,6 mg/dL

Cálculo de %CV máx aceptable
 $\%CV = DE / Media \times 100$
 $\%CV = 5,6 / 75 \times 100 = 7.5\%$

SIEMENS

Dimension Vista[®] System
Flex[®] reagent cartridge

Glucosa

Características específicas de funcionamiento

Los siguientes datos representan el rendimiento típico del Sistema Dimension Vista[®].

| Material | Precisión ^{9, e} | |
|--------------------------------|---------------------------|---|
| | Media mg/dL [mmol/L] | Desviación estándar (%CV) Repetibilidad Intralab |
| Suero | | |
| Control Multiquel [®] | | |
| Nivel 1 | 75 [4.16] | 1 [0.07] (2) 2 [0.12] (3) |
| Nivel 2 | 379 [21.03] | 4 [0.24] (1) 8 [0.46] (2) |



SIEMENS

Dimension Vista[®] System
Flex[®] reagent cartridge

Glucosa

Repetibilidad

Para el Nivel 1
Media = 75 mg/dL
DE= 1 mg/dL
%CV = 2 %

Precisión Intralab

Para el Nivel 1
Media = 75 mg/dL
DE= 2 mg/dL
%CV = 3 %



Pasos a Seguir – EP15-A3

Seleccionar el material

- Control de calidad, material de ensayos de aptitud (pruebas de proficiencia)
- Muestras de pacientes (individuales o pool de muestras)
- Materiales estables 5-7 días
- 2 niveles
 - Concentración cercana a niveles de decisión clínica
 - Concentración cercana a la usada por el fabricante



Ejemplo Glucosa Siemens Vista

| Material | Precisión ^{9, e} | |
|--------------------|---------------------------|--|
| | Media mg/dL [mmol/L] | Desviación estándar (%CV) Repetibilidad Intralab |
| Suero | | |
| Control Multiquel® | | |
| Nivel 1 | 75 [4.16] | 1 [0.07] (2) 2 [0.12] (3) |
| Nivel 2 | 379 [21.03] | 4 [0.24] (1) 8 [0.46] (2) |

| Analito | CLIA %ETp | Nivel de decisión clínica | Error total | Máxima SD CLIA (ET/4 para S _R) (ET/3 para S _{WL}) | Repetibilidad (σ _R) | Precisión Intralab (σ _{WL}) |
|---------|-------------------------|---------------------------------|---------------|--|------------------------------------|---|
| Glu | ± 6 mg/dL o ± 10% | Nivel 1 75 mg/dL | 7,5 mg/dL | 1,9 mg/dL 2,5 mg/dL | 1 mg/dL | 2 mg/dL |
| | | Nivel 2 379 mg/dL | 37,9 mg/dL | 9,5 mg/dL 12,6 mg/dL | 4 mg/dL | 8 mg/dL |

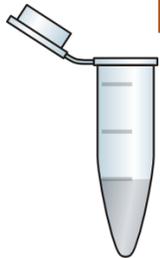
Ejemplo Glucosa Siemens Vista

- Desempeño de precisión descrito por el fabricante

| Material | Precisión ^{9, e} | | |
|--------------------|---------------------------|---------------------------|--------------|
| | Media mg/dL [mmol/L] | Desviación estándar (%CV) | |
| | | Repetibilidad | Intralab |
| Suero | | | |
| Control Multiquel® | | | |
| Nivel 1 | 75 [4.16] | 1 [0.07] (2) | 2 [0.12] (3) |
| Nivel 2 | 379 [21.03] | 4 [0.24] (1) | 8 [0.46] (2) |

| | Media, mg/dL | Repetibilidad SD, mg/dL (%CV) | Precisión Intralab SD, mg/dL (%CV) |
|---------|-----------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| Nivel 1 | 75 | 1 (2) | 2 (3) |
| Nivel 2 | 379 | 4 (1) | 8 (2) |

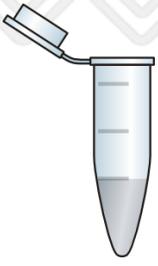
Material de CC – Nivel 1 – Glucosa target = 100 mg/dL



- Paso 1: Definir los requisitos de calidad

| Nivel de decisión clínica del material a utilizar | CLIA %ETp (10%) Max SD ET/4 y ET/3 | Precisión Esperada (descrita por el fabricante) | | Desempeño máximo del material (ajustado al fabricante) | |
|---|--|---|---|--|---------------------------------------|
| | | Repetibilidad (%CV _R) | Precisión Intralab (%CV _{WL}) | Repetibilidad (σ _R) | Precisión Intralab (σ _{WL}) |
| 100 mg/dL | 10 mg/dL 2,5 mg/dL 3,3 mg/dL | | | | |





Material de CC – Nivel 1 – Glucosa target = 100 mg/dL

- Paso 2: Definir materiales y niveles a verificar

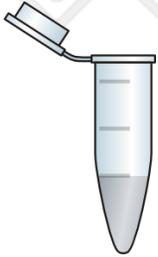
Tenemos que calcular los valores de repetibilidad y precisión intralab en nuestro propio laboratorio

| Nivel de decisión clínica del material a utilizar | CLIA %ETp Max SD | Precisión Esperada (descrita por el fabricante) | | Desempeño máximo del material (ajustado al fabricante) | |
|---|------------------------|---|---|--|--------------------------------------|
| | | Repetibilidad (%CV _R) | Precisión Intralab (%CV _{WL}) | Repetibilidad (σ_R) | Precisión Intralab (σ_{WL}) |

100 mg/dL

No sabemos cuál es la DE cuando la media es 100 mg/dL, pero la podemos calcular porque tenemos el CV%

Material de CC – Nivel 1 – Glucosa target = 100 mg/dL



| Nivel de decisión clínica del material a utilizar | CLIA %ETp (10%) Max SD ET/4 y ET/3 | Precisión Esperada (descrita por el fabricante) | | Desempeño máximo del material (ajustado al fabricante) | |
|---|---------------------------------------|---|---|--|---------------------------------------|
| | | Repetibilidad (%CV _R) | Precisión Intralab (%CV _{WL}) | Repetibilidad (σ _R) | Precisión Intralab (σ _{WL}) |
| 100 mg/dL | 10 mg/dL 2,5 mg/dL 3,3 mg/dL | | | | |

| | Media, mg/dL | Repetibilidad SD, mg/dL (%CV) | Precisión Intralab SD, mg/dL (%CV) |
|---------|--------------|-------------------------------|------------------------------------|
| Nivel 1 | 75 | 1 (2%) | 2 (3%) |

SD = %CV x media/100

$SD_R = 2 \times 100 \text{ mg/dL}/100 = 2 \text{ mg/dL}$

$SD_{WL} = 3 \times 100 \text{ mg/dL}/100 = 3 \text{ mg/dL}$

Acordarse de estos resultados

PASO 3

Diseño y ejecución del experimento

- Correr 5 replicados de cada concentración durante 5 días
- Más días pueden ser necesarios
- Se deben preparar 5 alícuotas o copas diferentes de cada nivel/material
 - Correrlas como muestras independientes
 - NO tomar replicados de la misma muestra en la misma copa





Repetibilidad

S_R CV_R

Verificar la presencia de valores aberrantes

Test de Grubs

Limites Grubs

Media $\pm G \times SD$

G=3.135 para 5 corridas y 25 datos

Intralaboratorio

S_{WL}

CV_w

| Nivel 1 | Rep 1 | Rep 2 | Rep 3 | Rep 4 | Rep 5 |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Día 1 | Rep1 | Rep2 | Rep3 | Rep4 | Rep5 |
| Día 2 | Rep1 | Rep2 | Rep3 | Rep4 | Rep5 |
| Día 3 | Rep1 | Rep2 | Rep3 | Rep4 | Rep5 |
| Día 4 | Rep1 | Rep2 | Rep3 | Rep4 | Rep5 |
| Día 5 | Rep1 | Rep2 | Rep3 | Rep4 | Rep5 |
| Nivel 2 | Rep 1 | Rep 2 | Rep 3 | Rep 4 | Rep 5 |
| Día 1 | Rep1 | Rep2 | Rep3 | Rep4 | Rep5 |
| Día 2 | Rep1 | Rep2 | Rep3 | Rep4 | Rep5 |
| Día 3 | Rep1 | Rep2 | Rep3 | Rep4 | Rep5 |
| Día 4 | Rep1 | Rep2 | Rep3 | Rep4 | Rep5 |
| Día 5 | Rep1 | Rep2 | Rep3 | Rep4 | Rep5 |



Analisis de los resultados

- ❑ Evaluar los resultados cada día – identificar errores
- ❑ Decisión de excluir valores
 - Tener en cuenta causas
 - Documentar las razones



Análisis de los resultados

Ejemplos que pueden causar que el método no se desempeñe de manera “esperada”

- Control de calidad “fuera de control”
- Niveles de control mezclados
- Presencia de coágulos en las muestras
- Errores en el sistema/instrumento
- Volumen de muestra insuficiente



Pasos a Seguir – EP15-A3

Calcular la precisión

- ★ Calcular Repetibilidad en base a los 25 o más replicados
 - Desviación estándar en condiciones de repetibilidad (S_R)
 - Coeficiente de Variación en condiciones de repetibilidad (CV_R)
- ★ Calcular la precisión intralaboratorio en base a 5 o más días con sus respectivos replicados
 - Desviación estándar en condiciones intralaboratorio (S_{WL})
 - Coeficiente de Variación en condiciones intralaboratorio (CV_{WL})



Ejemplo Glucosa Siemens Vista

5 días
5 replicas

| Fecha | Dia/Corrida | Replica 1 | Replica 2 | Replica 3 | Replica 4 | Replica 5 | Media Intracorrida | DE Intracorrida | Varianza Intracorrida |
|------------|-----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------------------|-----------------|-----------------------|
| 10/10/2023 | 1 | 100.0 | 99.0 | 96.0 | 97.0 | 98.0 | 98.0 | 1.6 | 2.5 |
| 10/11/2023 | 2 | 97.0 | 101.0 | 102.0 | 98.0 | 103.0 | 100.2 | 2.6 | 6.7 |
| 10/12/2023 | 3 | 103.0 | 102.0 | 101.0 | 100.0 | 99.0 | 101.0 | 1.6 | 2.5 |
| 10/13/2023 | 4 | 99.0 | 99.0 | 101.0 | 100.0 | 98.0 | 99.4 | 1.1 | 1.3 |
| 10/14/2023 | 5 | 101.0 | 99.0 | 98.0 | 101.0 | 100.0 | 99.8 | 1.3 | 1.7 |
| | Media Intracorrida | 100.0 | 100.0 | 99.6 | 99.2 | 99.6 | | | |
| | DE Intracorrida | 2.2 | 1.4 | 2.5 | 1.6 | 2.1 | | | |
| | %CV | 2.2 | 1.4 | 2.5 | 1.7 | 2.1 | | | |
| | Varianza Intracorrida | 5.0 | 2.0 | 6.3 | 2.7 | 4.3 | | | |

| | |
|--------------------------------|--------------|
| Numero de observaciones | 25 |
| Media Total | 99.68 |
| $SD_{(R)}$ | 1.71 |
| $SD_{(WL)}$ | 1.98 |

$$SD_R = 2 \times 100 \text{ mg/dL}/100 = 2 \text{ mg/dL}$$

$$SD_{WL} = 3 \times 100 \text{ mg/dL}/100 = 3 \text{ mg/dL}$$



¿Cómo sabemos si el desempeño del ensayo se ha verificado?

Comparar la precisión en condiciones de repetibilidad (S_R) e intralaboratorio (S_{WL}) obtenidas por el laboratorio con las especificaciones del fabricante para precisión en condiciones de repetibilidad (σ_R) e intralaboratorio (σ_{WL})



Ejemplo Glucosa Siemens Vista

5 días
5 replicas

| Fecha | Dia/Corrida | Replica 1 | Replica 2 | Replica 3 | Replica 4 | Replica 5 | Media Intracorrida | DE Intracorrida | Varianza Intracorrida |
|------------|-----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------------------|-----------------|-----------------------|
| 10/10/2023 | 1 | 100.0 | 99.0 | 96.0 | 97.0 | 98.0 | 99.0 | 1.6 | 2.5 |
| 10/11/2023 | 2 | 97.0 | 101.0 | 102.0 | 98.0 | 100.0 | 99.6 | 2.6 | 6.7 |
| 10/12/2023 | 3 | 103.0 | 102.0 | 101.0 | 100.0 | 99.0 | 101.0 | 1.6 | 2.5 |
| 10/13/2023 | 4 | 99.0 | 99.0 | 101.0 | 100.0 | 99.0 | 99.6 | 1.1 | 1.3 |
| 10/14/2023 | 5 | 101.0 | 99.0 | 98.0 | 99.0 | 99.0 | 99.6 | 1.3 | 1.7 |
| | Media Intracorrida | 100.0 | 100.0 | 99.6 | 99.6 | 99.6 | 99.68 | | |
| | DE Intracorrida | 2.2 | 1.1 | 1.1 | 1.1 | 2.1 | | | |
| | %CV | 2.2 | 1.1 | 1.1 | 1.1 | 2.1 | | | |
| | Varianza Intracorrida | 5.0 | 2.2 | 2.2 | 2.7 | 4.3 | | | |

Verificado

| | |
|-------------------------|-------|
| Numero de observaciones | 25 |
| Media Total | 99.68 |
| $SD_{(R)}$ | 1.71 |
| $SD_{(WL)}$ | 1.98 |

$$SD_R = 2 \times 100 \text{ mg/dL} / 100 = 2 \text{ mg/dL}$$

$$SD_{WL} = 3 \times 100 \text{ mg/dL} / 100 = 3 \text{ mg/dL}$$



Posibles Causas de Resultados Fuera de Parámetros Aceptables

- Almacenamiento inadecuado de reactivos
- Manejo inadecuado de reactivos
- Manejo inadecuado de muestras
- Muestras inestables
- Diferencias en la matriz de las muestras utilizadas para los experimentos de precisión
- Técnica de pipeteo variable
- Mantenimiento inadecuado de los equipos
- Condiciones ambientales en el laboratorio (temperatura, humedad, corriente eléctrica)

Precisión simple = no está incluida en el EP 15 A3

- ★ 2 concentraciones del analito
- ★ 1 corrida
- ★ 10 repeticiones
- ★ Cálculo de la SD y de la CV
- ★ Comparación con la DS y el CV% de la repetibilidad



Verificación del Rango Analítico

Material a usar:

CAP tiene un material para hacer la verificación del rango lineal

Dos envíos anuales

Evaluación de la calibración

Evaluación de la linealidad

Resultados rápidos

Matriz apropiada

Especímenes de pacientes

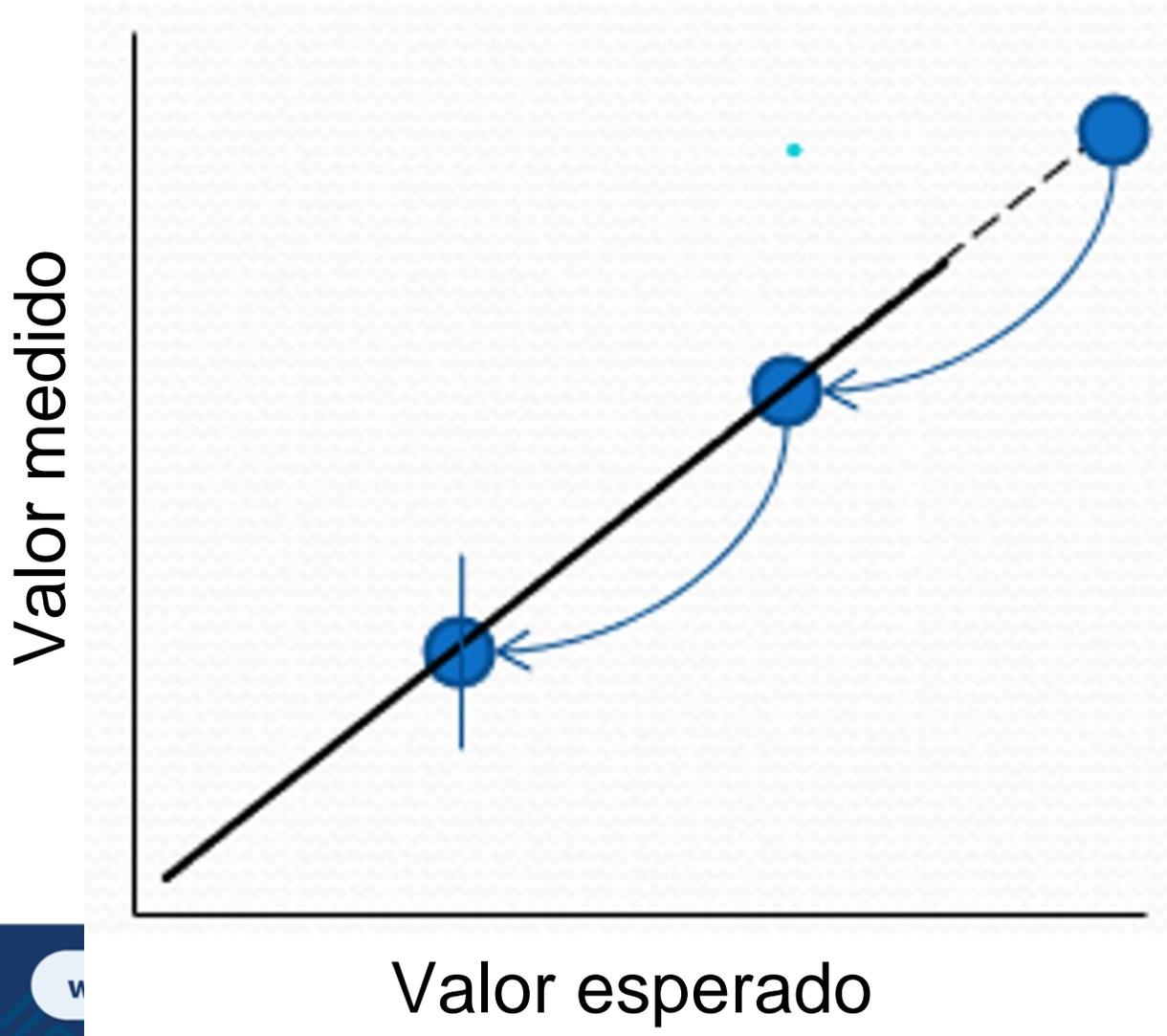
Material de referencia

CC

EP 6 no muy
práctica

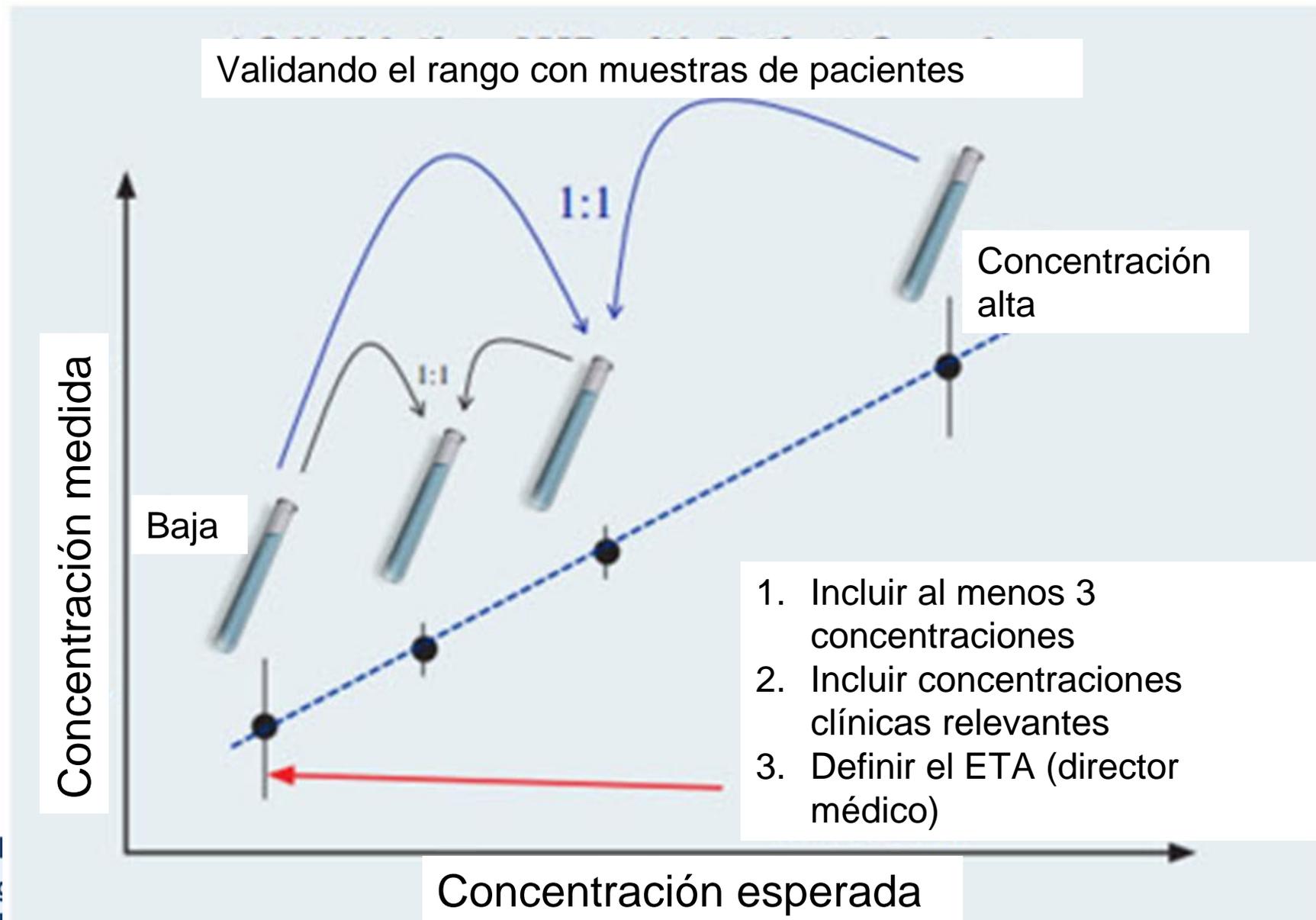


Rango analítico: comparación del valor medido con el valor esperado



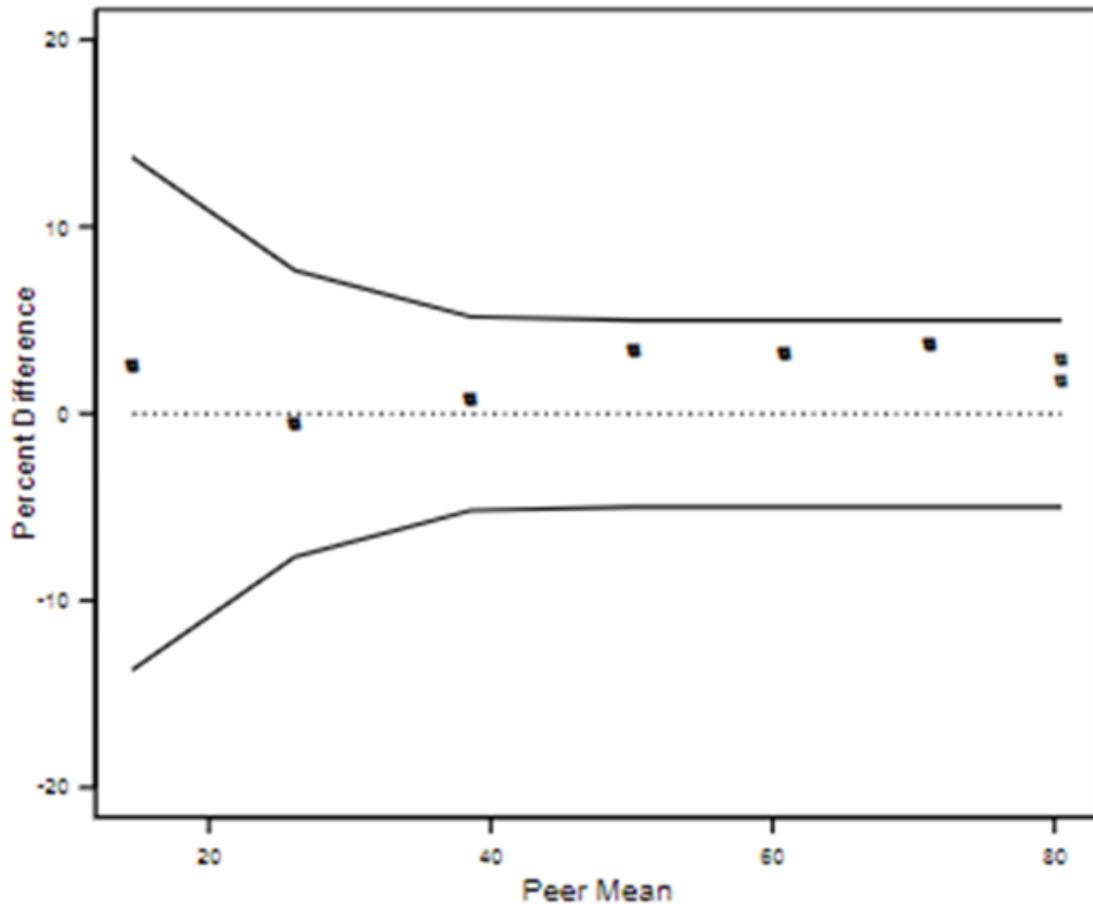
1. Se toma una muestra de valor conocido y se la diluye
2. Se calcula el valor esperado y se grafica en el eje de las X
3. Se mide el analito de interés y se grafica en el eje de las Y

Sesión didáctica del CAP: ejemplo prestado



Rango analítico: Uso de material comercial CAP

Calibration Verification Plot: Percent Differences with Allowable Error Limits



valuation Result: Verified from 15.00 to 82.50

Peer Instrument:
Peer Method:

Allowable Error: 5% or 2 g/L,
whichever is greater

| Specimen | Assay 1 | Assay 2 | Your Mean | Peer Mean | Peer N | Difference | Allowable Error |
|----------|---------|---------|-----------|-----------|--------|------------|-----------------|
| LN-28 | 15.0 | 15.0 | 15.00 | 14.60 | 69 | 0.40 g/L | ± 2.00 g/L |
| LN-29 | 26.0 | 26.0 | 26.00 | 26.10 | 69 | -0.10 g/L | ± 2.00 g/L |
| LN-30 | 39.0 | 39.0 | 39.00 | 38.60 | 69 | 0.40 g/L | ± 2.00 g/L |
| LN-31 | 52.0 | 52.0 | 52.00 | 50.20 | 69 | 3.6% | ± 5.0% |
| LN-32 | 63.0 | 63.0 | 63.00 | 60.90 | 69 | 3.4% | ± 5.0% |
| LN-33 | 74.0 | 74.0 | 74.00 | 71.20 | 65 | 3.9% | ± 5.0% |
| LN-34 | 82.0 | 83.0 | 82.50 | 80.50 | 65 | 2.5% | ± 5.0% |

Se compara nuestros resultados con los resultados de valores en laboratorios pares

Peer Results Summary Table:

Evaluation of Instrument Performance

Your evaluation may not be included in the peer results.

Peer Group Size: 69

| Range | Calibration Verification | | Linearity Evaluation | | |
|------------|--------------------------|-------------|----------------------|-------------|-------------|
| | % Verified | % Different | % Linear | % Nonlinear | % Imprecise |
| LN-28 - 34 | 84.1 | 8.7 | 91.3 | 0.0 | 0.0 |
| LN-28 - 33 | 1.4 | 0.0 | 2.9 | 0.0 | 0.0 |
| LN-28 - 32 | 5.8 | 0.0 | 5.8 | 0.0 | 0.0 |

Resumen

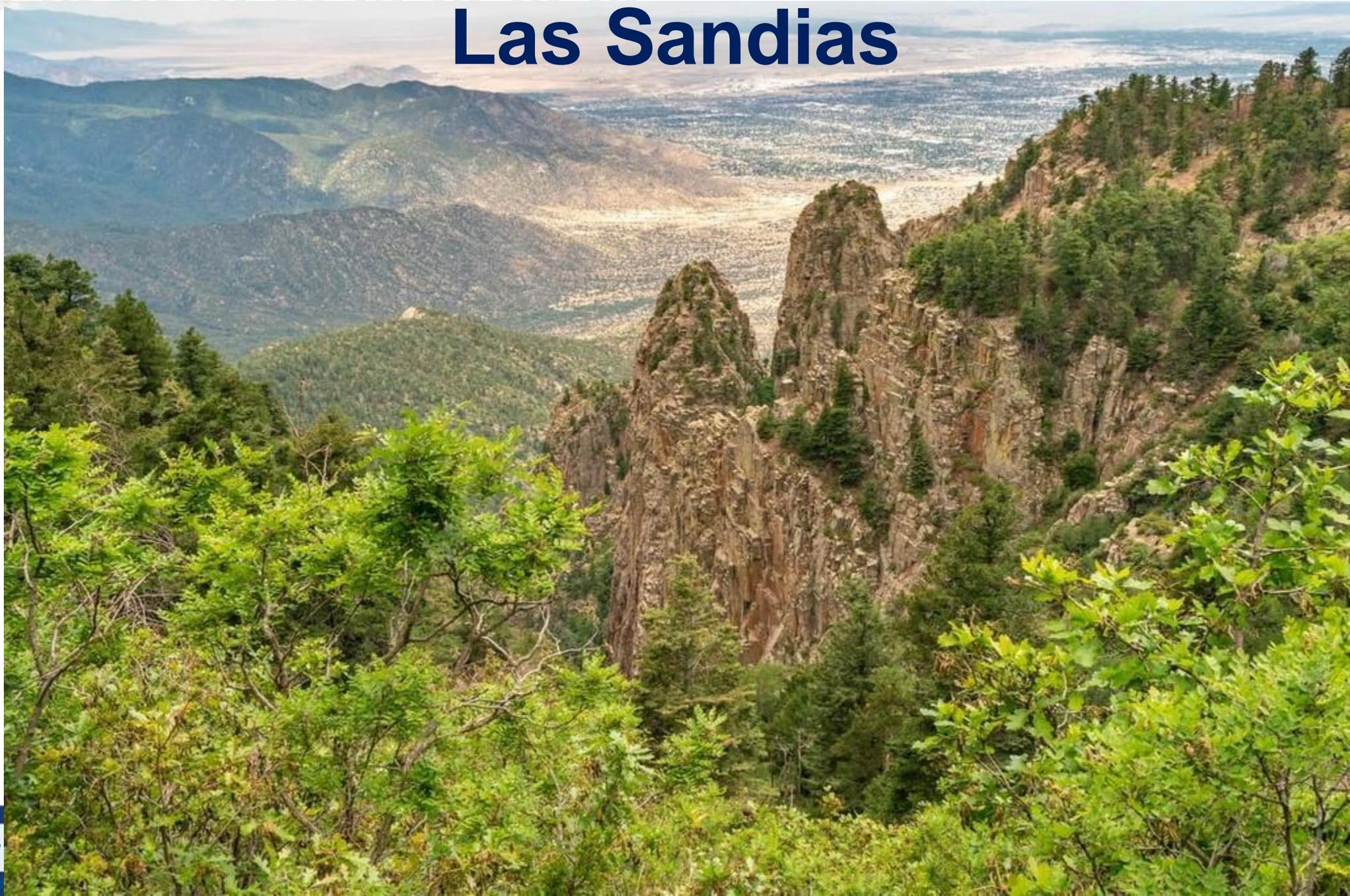
- Los procedimientos de examen deben ser verificados para asegurar que las especificaciones de desempeño del procedimiento son aptas para el uso previsto del método
- La guía CLSI brindan ideas para la verificación y nos ayudan a planear como mejor verificar el desempeño de un método.
- Siempre analizar los datos por errores, o cosas que no concuerdan con lo esperado.
- Formas prácticas para verificar la precisión y la linealidad



Nuevo Mexico, USA



Las Sandias



Temas a tratar (2da Sesión)

- Verificación y sesgo
- Lista de guías CLSI: EP 09 & EP 15
- Ejemplos de comparaciones cuantitativas
- Verificación de métodos cualitativos



Veracidad y Sesgo

- **Veracidad (de una medición)**
 - Proximidad o acuerdo entre el valor promedio obtenido a partir de una serie de resultados obtenidos sobre el mismo material y un valor de referencia aceptado
- **Sesgo (de una medición)**
 - Medida de la veracidad
 - Estimación del error sistemático
 - Equivalente al término “diferencia”



Comparación de Métodos

Establecer el sesgo

Fabricantes

Validar el sesgo

Fabricantes

Verificar/
estimar el sesgo

Laboratorios



Estimación de Sesgo

| Si se desea averiguar | Material a utilizar |
|--|---------------------------------|
| El sesgo de nuestro laboratorio comparado con el resto de los usuarios | Material de pruebas de aptitud |
| El sesgo de nuestro método comparado con el método de referencia | Material de referencia (NIST) |
| Si nuestros instrumentos dan resultados semejantes a otros instrumentos habilitados (en nuestro o en otro laboratorio) | Muestras de pacientes divididas |



Estimación de Sesgo (continuación)

Comparabilidad

- Muestra dividida
- Muestras de pacientes a través del rango reportable
- Evaluación de la diferencia

Recuperación de valores esperados

- Materiales con valores esperados
- Materiales de referencia
- Evaluación de la diferencia





CLINICAL AND
LABORATORY
STANDARDS
INSTITUTE®

3rd Edition

EP09c

Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples



CLINICAL AND
LABORATORY
STANDARDS
INSTITUTE®

September 2014

EP15-A3

User Verification of Precision and Estimation of Bias; Approved Guideline—Third Edition

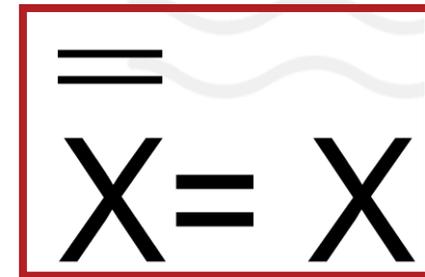


Diferencias entre la EP15-A3 y la EP09-C

| Característica | EP15-A3 | EP09-C |
|--------------------------|----------------------|------------------|
| Numero de muestras (min) | depende | 20-40 |
| Rango a usar (min) | 2 concentraciones | Rango linear |
| Repeticiones | 5 | 1 |
| Duración (min) | 5 dias | 1 dia |
| Estadísticas | ANOVA – t de Student | Regresión linear |
| Error total | Si | Si |
| Sesgo o veracidad | Estima el sesgo | Estima el sesgo |

Enfoque en la Guía EP15-A3

- Evalúa la imprecisión y el sesgo simultáneamente
- El protocolo de imprecisión se recomienda para evaluar reclamos previamente validados por el fabricante.
- El sesgo se evalúa con 25 mediciones con 5 (o más) repeticiones en 5 días (no necesariamente consecutivos)
- Cálculo de la media total
- Cálculo del error total estándar – EE
- Se deben decidir los materiales de antemano si se decide utilizar EP15-A3 para precisión y sesgo



EP15-A3 - Materiales

Concentración establecida

- Patrones o estándares de referencia (IFCC, NIST) certificados y trazables
- Materiales de ensayos de aptitud o programas de evaluación externa de la calidad
- Muestras de pacientes cuyas concentraciones fueron establecidas a través de un método de referencia trazable



Enfoque en la Guía EP-09

- Evalúa el sesgo de un método en comparación con un método estándar o de referencia.
- La guía describe diferentes formas de investigar el sesgo
- Es ideal para los fabricantes de reactivos
 - También contiene una sección dedicada a los laboratorios clínicos



Evaluación de los Reclamos del Fabricante

- El plan debe especificar
 - Calibraciones y controles
 - Número de muestras a comparar
 - Rango a estudiar
 - Número de replicas
 - Días de estudio – estabilidad
 - Eliminación de valores aberrantes
 - Sesgo aceptable
 - ¿Se aceptará el intervalo de referencia usado?



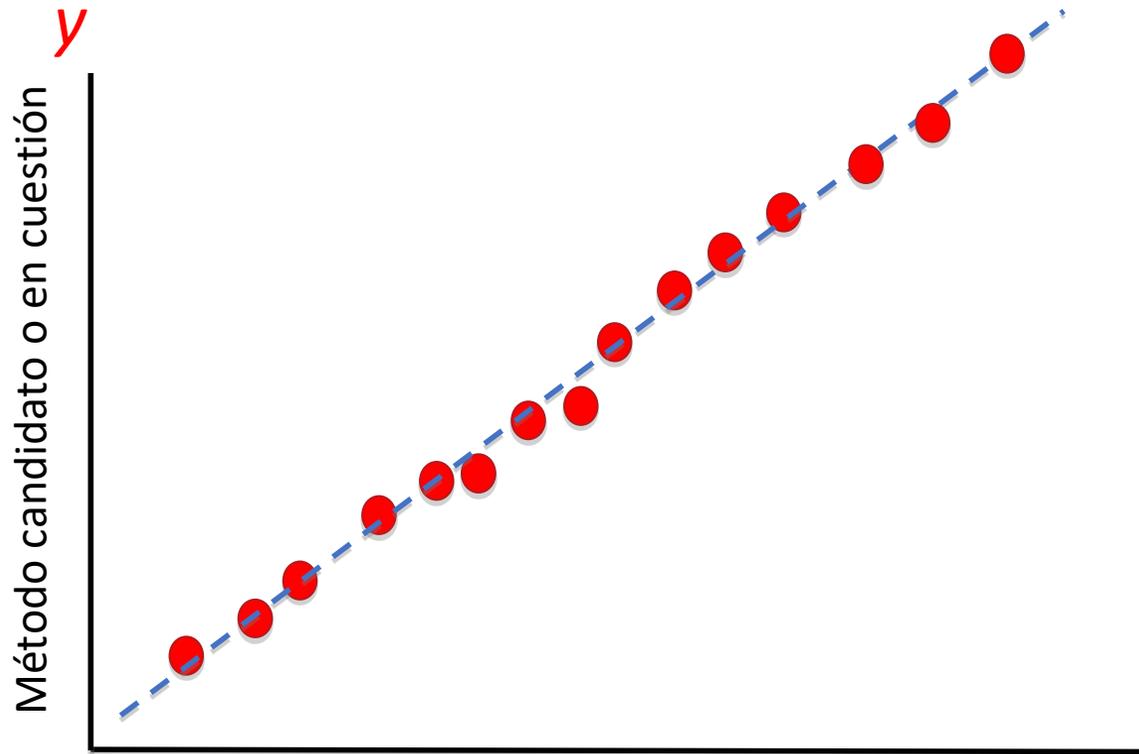
Estudio Típico de Evaluación de Sesgo

| Tipo de estudio | ¿Quién lo hace? | Número de muestras | Repeticiones | Análisis a usar |
|------------------------------|---------------------|--------------------|--------------|---------------------------------------|
| Establecimiento de desempeño | Fabricante | > 100 | 1 o más | Regresión |
| Verificación de reclamos | Fabricante | > 100 | 1 | Regresión |
| Verificación inicial | Laboratorio clínico | > 40 | 1 o más | Gráfico de diferencias o de regresión |

Veracidad/Exactitud: Comparación de métodos

Analizar 20-40 muestras

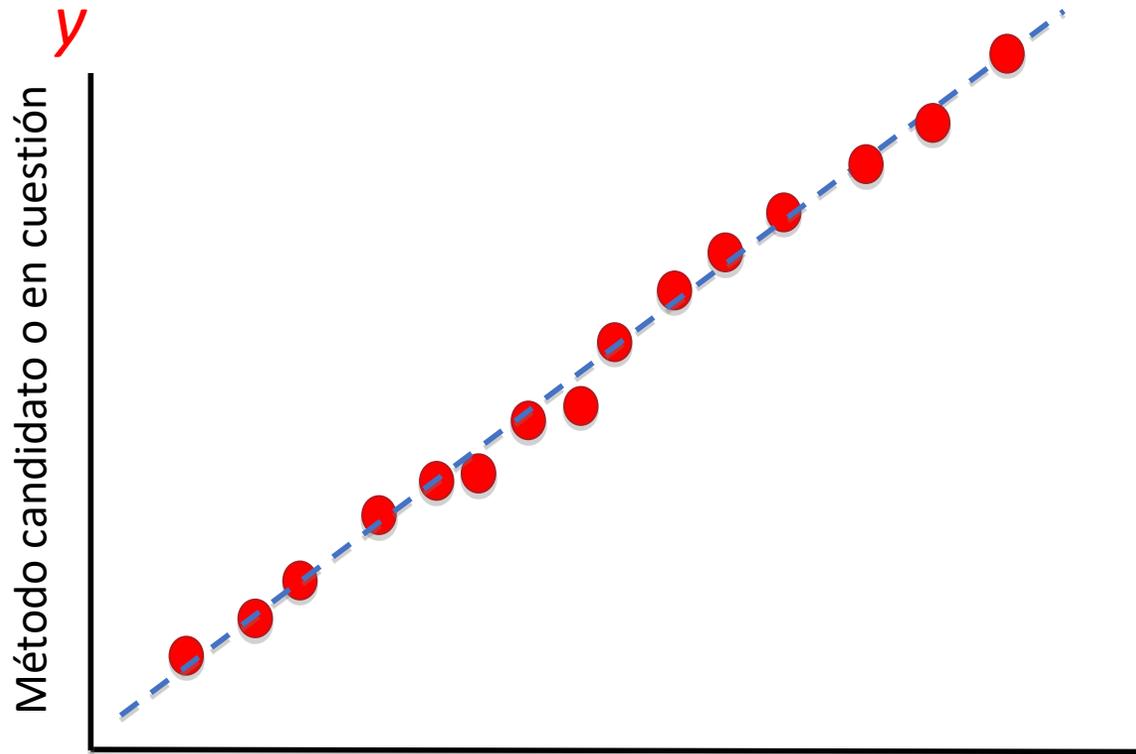
Método de comparación en el eje de las abscisas 'x'
Método a evaluar en el eje de las ordenadas 'y'



Veracidad/Exactitud: Comparación de métodos

Analizar 20-40 muestras

Método de comparación en el eje de las abscisas 'x'
Método a evaluar en el eje de las ordenadas 'y'



Regresión lineal

$$y = ax + b$$

Regresión Lineal

$$y = ax + b$$

a = pendiente

% diferencia (sesgo)

b = intersección

valor absoluto de diferencia
(sesgo)

R = coeficiente de
correlacion

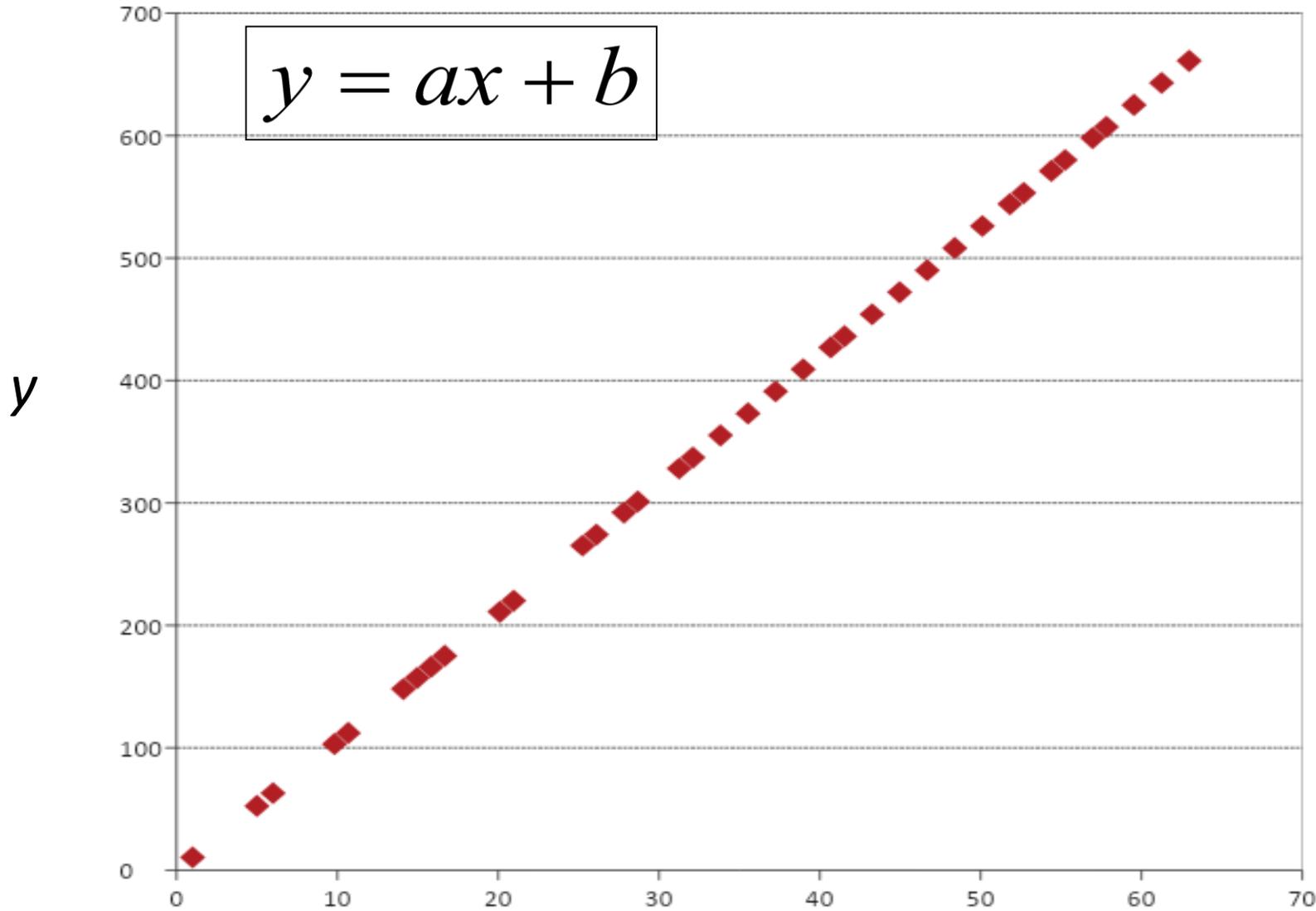
dispersión (imprecisión)

$S_{y/x}$ DE alrededor de
la linea

dispersión (imprecisión)



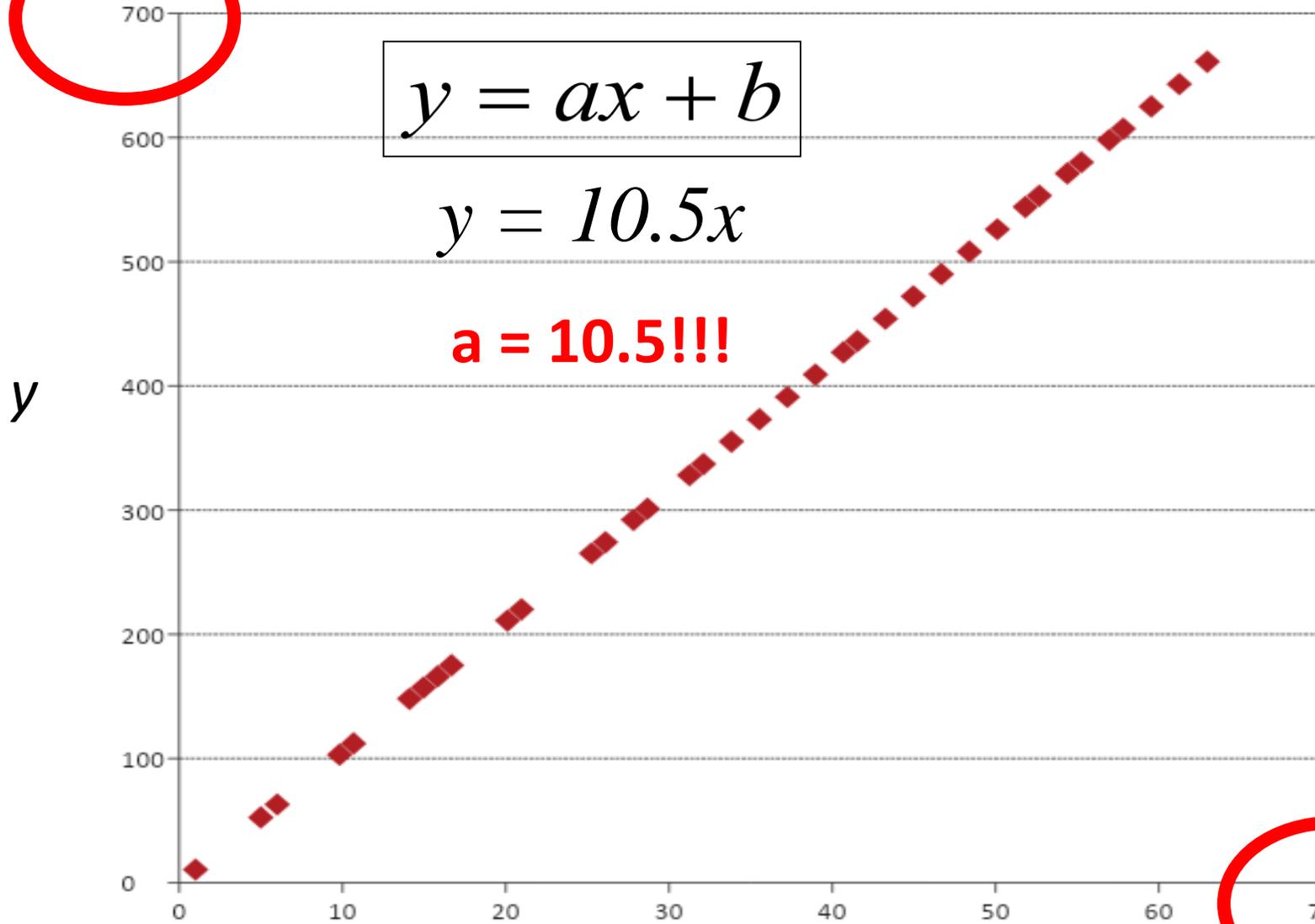
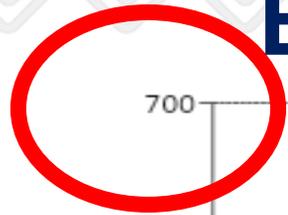
Ejercicio: hay un error en esta grafica



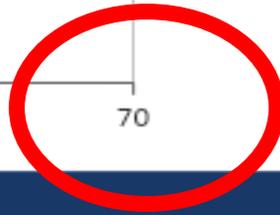
Revisar los
datos y las
gráficas
visualmente



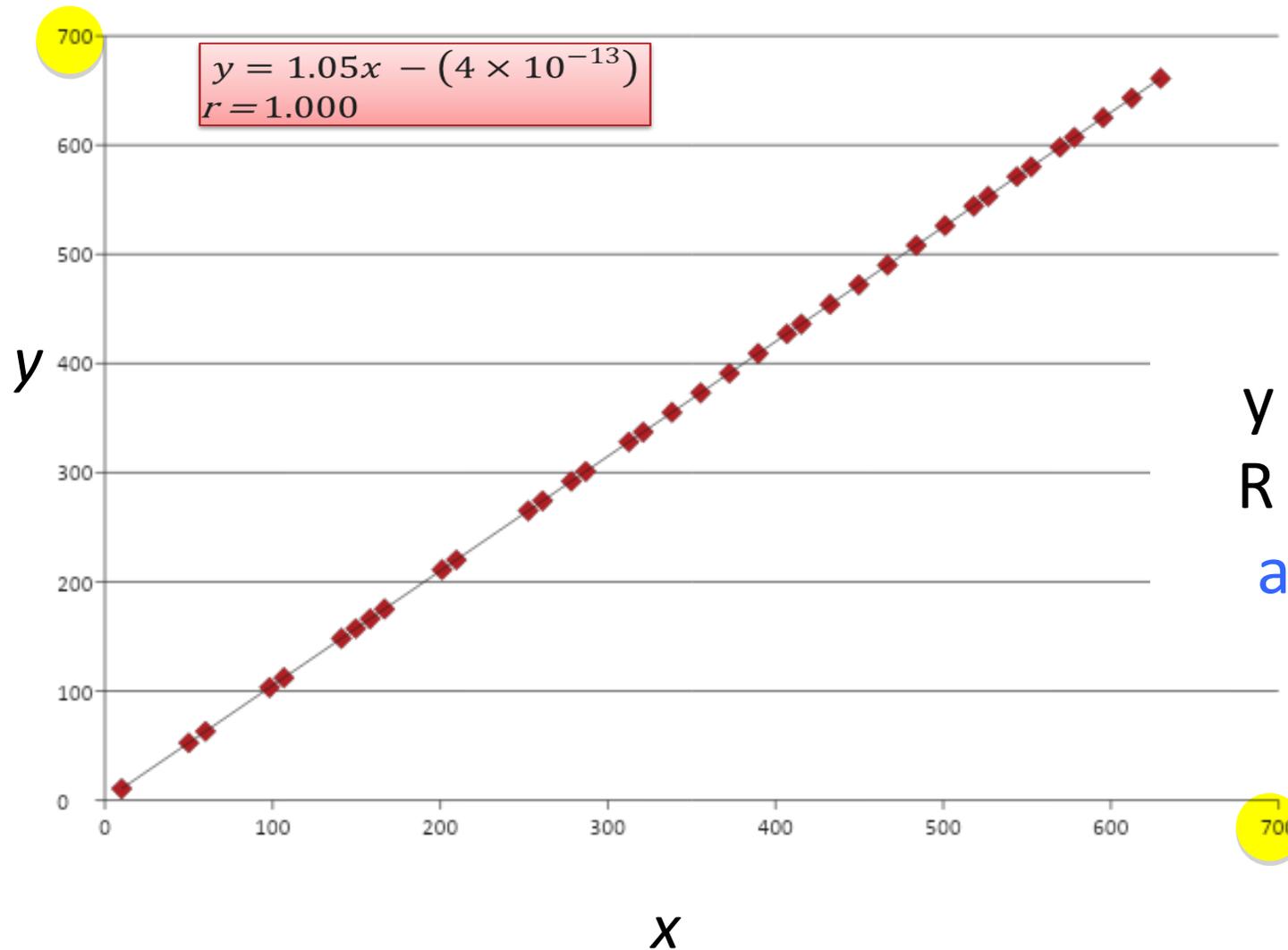
Ejercicio: hay un error en esta grafica



Revisar los
datos y las
gráficas
visualmente



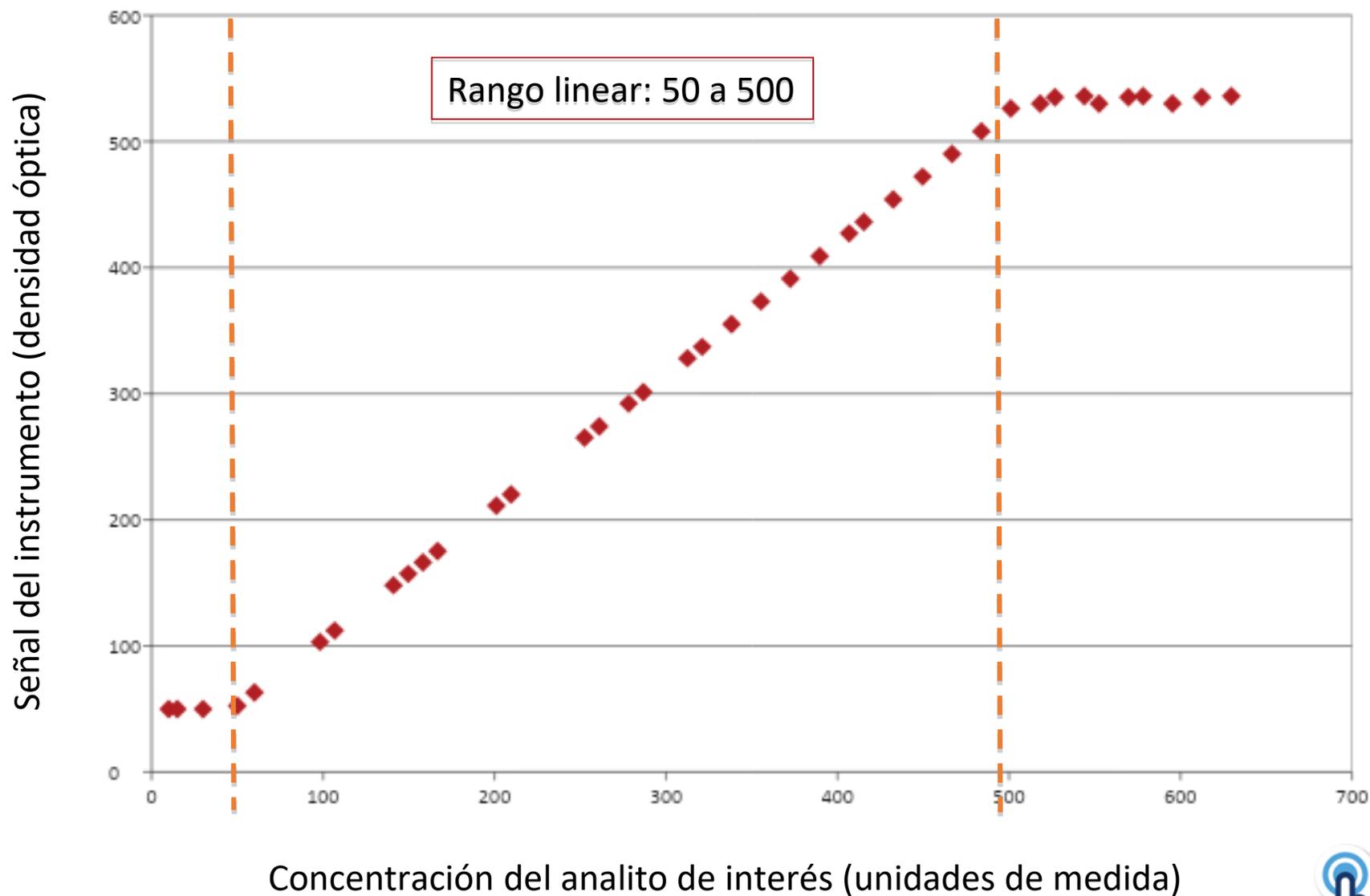
Idealmente....



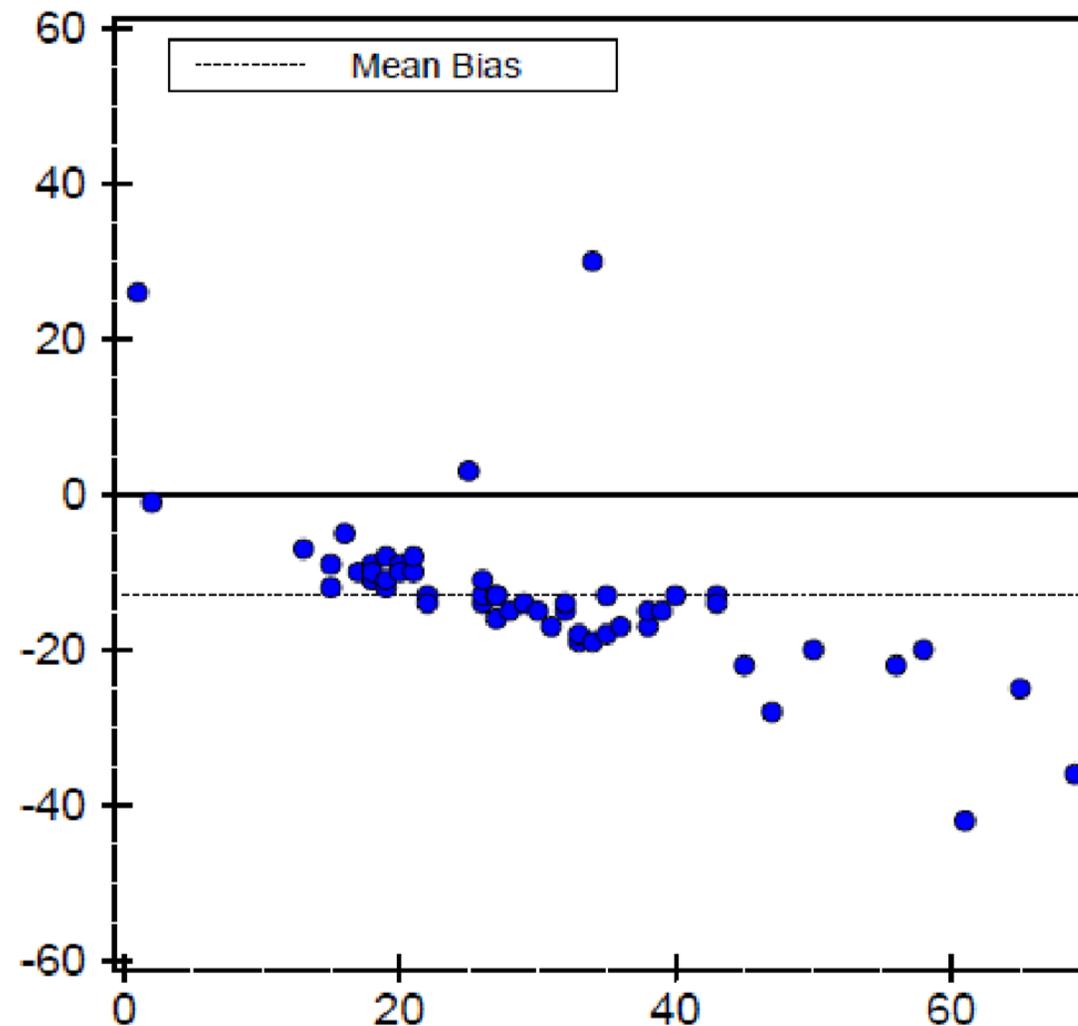
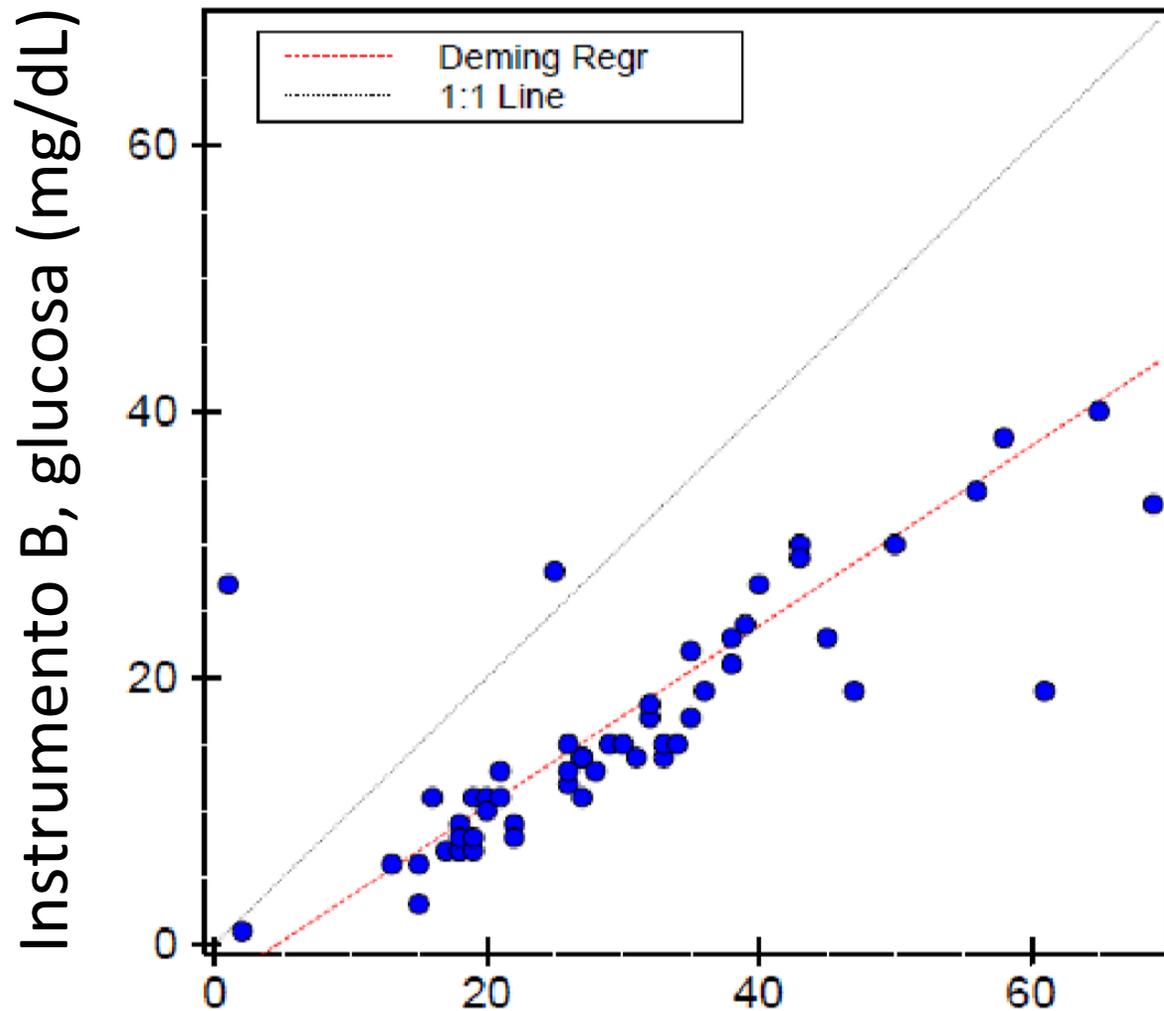
$y = 1.05x$
 $R = 1.000$
 $a = 1.05$



Uso de muestras en el rango lineal

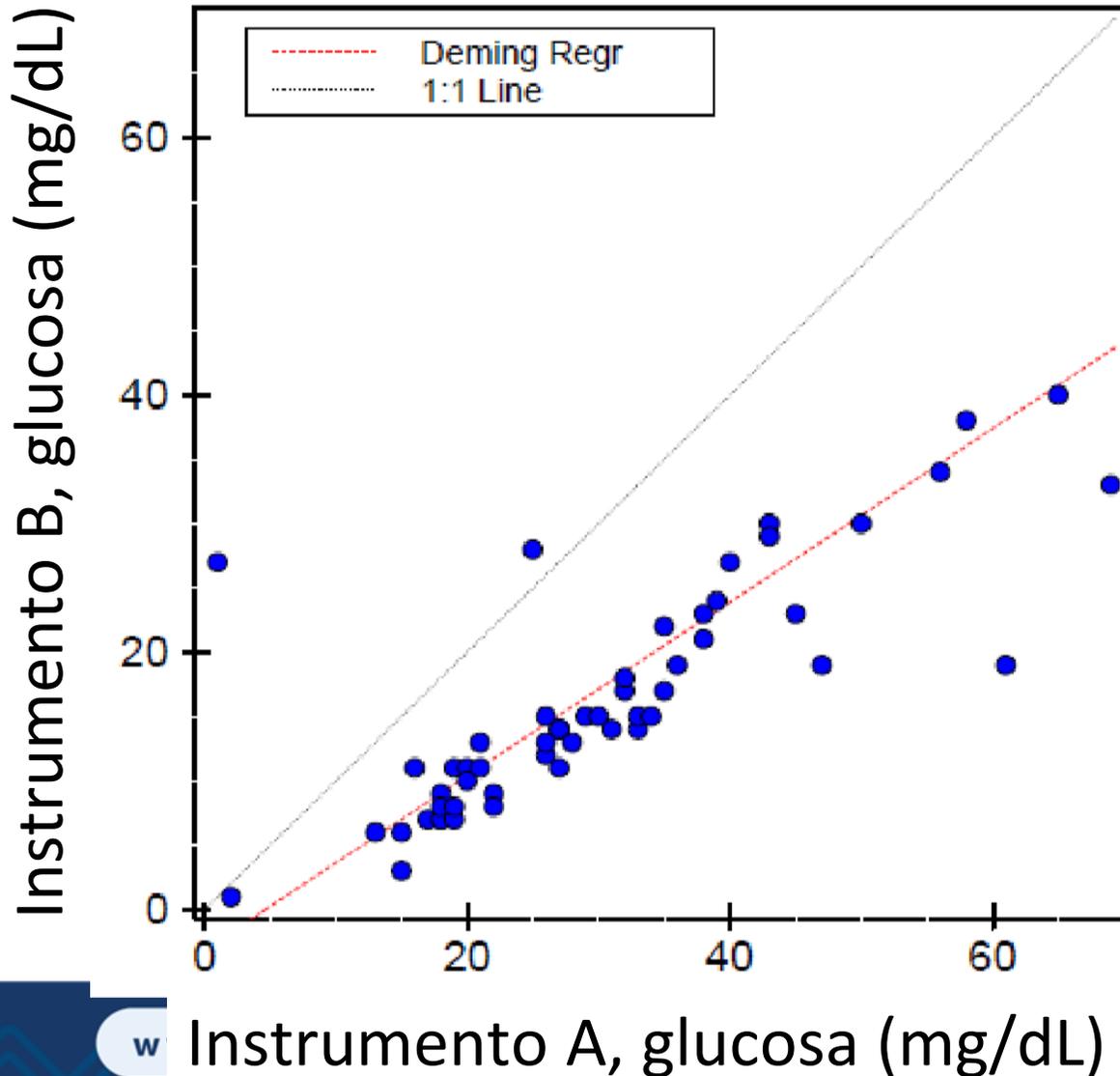


Ejercicio: comparación de métodos



Ejercicio: comparación de métodos

Rango Lineal: 5-800 mg/dL

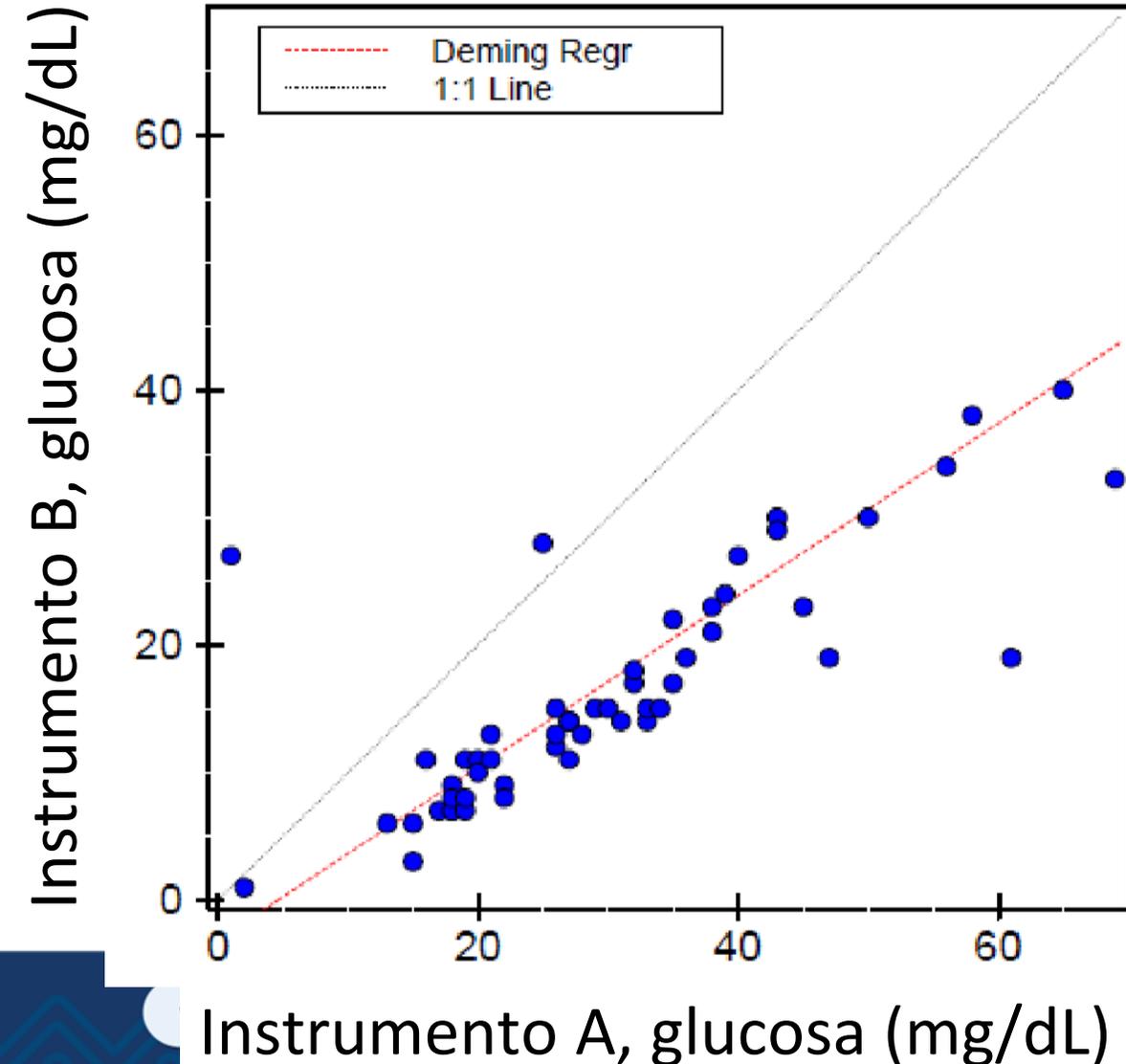


Basado en los conocimientos adquiridos analice los datos de la tabla y los gráficos. Responda verdadero o falso sobre las siguientes observaciones:

1. El instrumento B probablemente produzca resultados más altos que el instrumento A
1. El sesgo observado aumenta con el valor medido
1. El estudio ha usado valores de glucosa que cubren el rango de linealidad
1. No se ha observado ningún valor aberrante en este estudio

Ejercicio: comparación de métodos

Rango Lineal: 5-800 mg/dL



Basado en los conocimientos adquiridos analice los datos de la tabla y los gráficos. Responda verdadero o falso sobre las siguientes observaciones:

1. El instrumento B probablemente produzca resultados más altos que el instrumento A
1. El sesgo observado aumenta con el valor medido
1. El estudio ha usado valores de glucosa que cubren el rango de linealidad
1. No se ha observado ningún valor aberrante en este estudio

F

V

F

F



Métodos cualitativos: verificación de los reclamos del fabricante



Evaluación del desempeño analítico

Si el laboratorio está acreditado por el Colegio de Patólogos Americanos o CAP y el método esta modificado o desarrollado en el laboratorio:

COM.40350 Validation of Test Performance Specifications - Modified FDA-cleared/ approved Tests and LDTs

Phase II



Prior to clinical use of each modified FDA-cleared or approved test and laboratory-developed tests (LDTs), the laboratory has performed a validation study and prepared a written assessment of each of the following test method performance specifications, as applicable, using a sufficient number of characterized samples:

- **Analytical accuracy**
- **Analytical precision**
- **Reportable range**
- **Analytical sensitivity (lower detection limit)**
- **Analytical specificity**
- **Any other performance characteristic required to ensure analytical test performance**



Métodos cualitativos: verificación de los reclamos del fabricante



Límite de detección
Sensibilidad clínica
Especificidad clínica



VERIFICACIÓN DEL DESEMPEÑO DE UN ENSAYO COMERCIAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS CoV-2



UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO
FACULTAD DE FARMACIA
ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA
MAGÍSTER ANÁLISIS CLÍNICO

gresocnb.com



KATHERINE MONTOYA



@congreso.cnb

EP12: Evaluación de métodos cualitativos



EP12-A2, volumen 28 N°3. User protocol for evaluation of Qualitative test performance. Marzo 2009



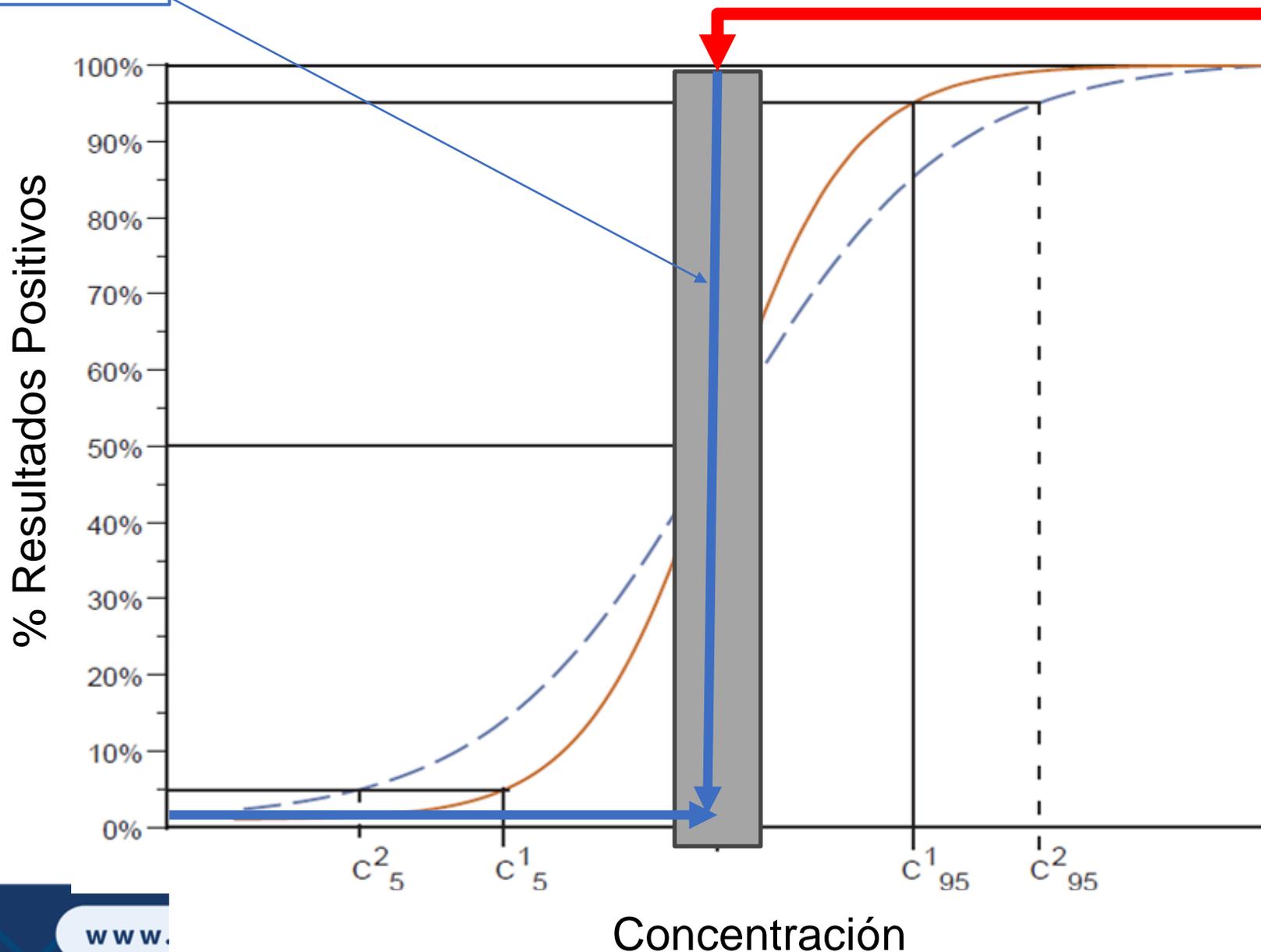
Umbral de detección

Umbral = dependiendo del umbral habrá más o menos resultados positivos o negativos. El número de los falsos resultados va a cambiar.



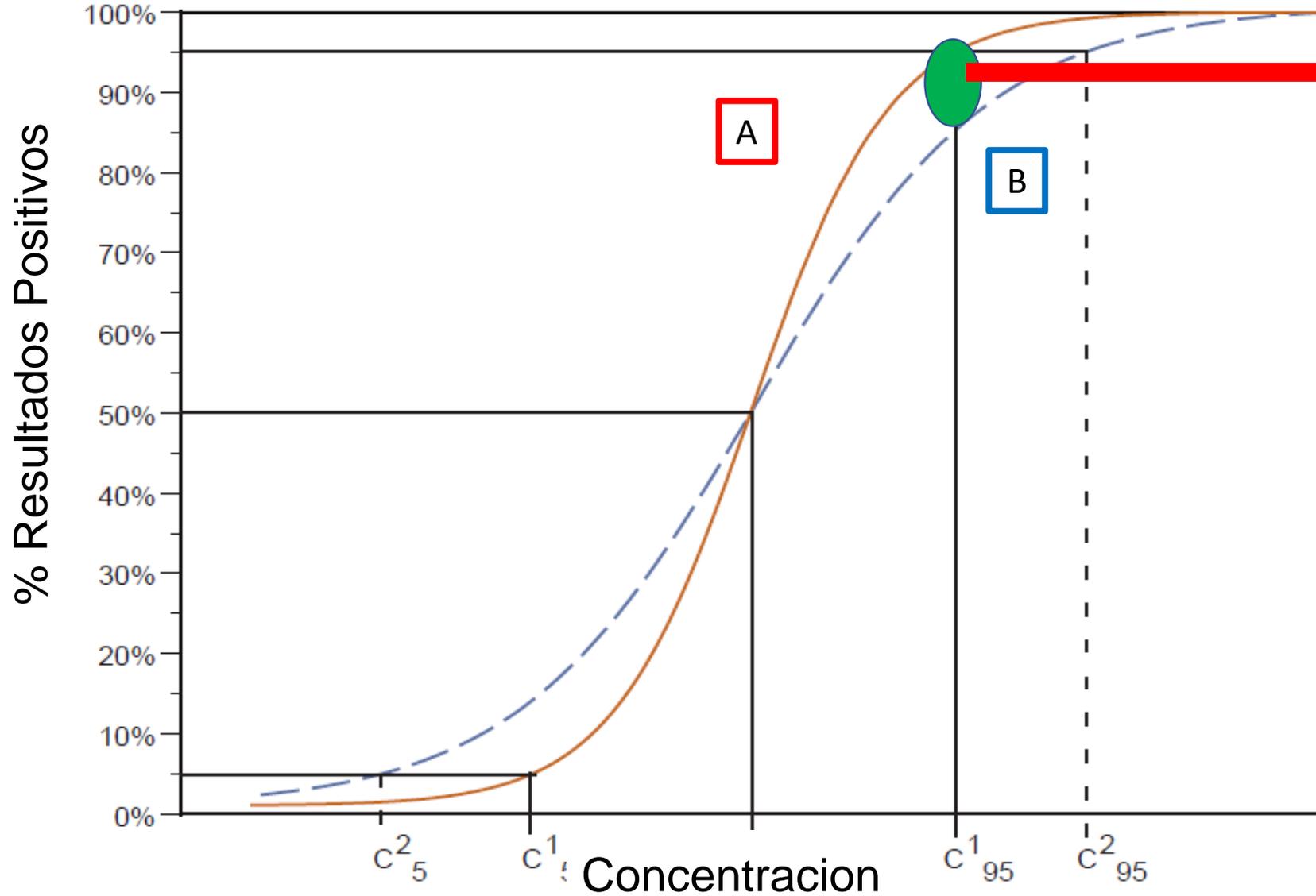
Pruebas cualitativas: típico umbral

Línea ideal



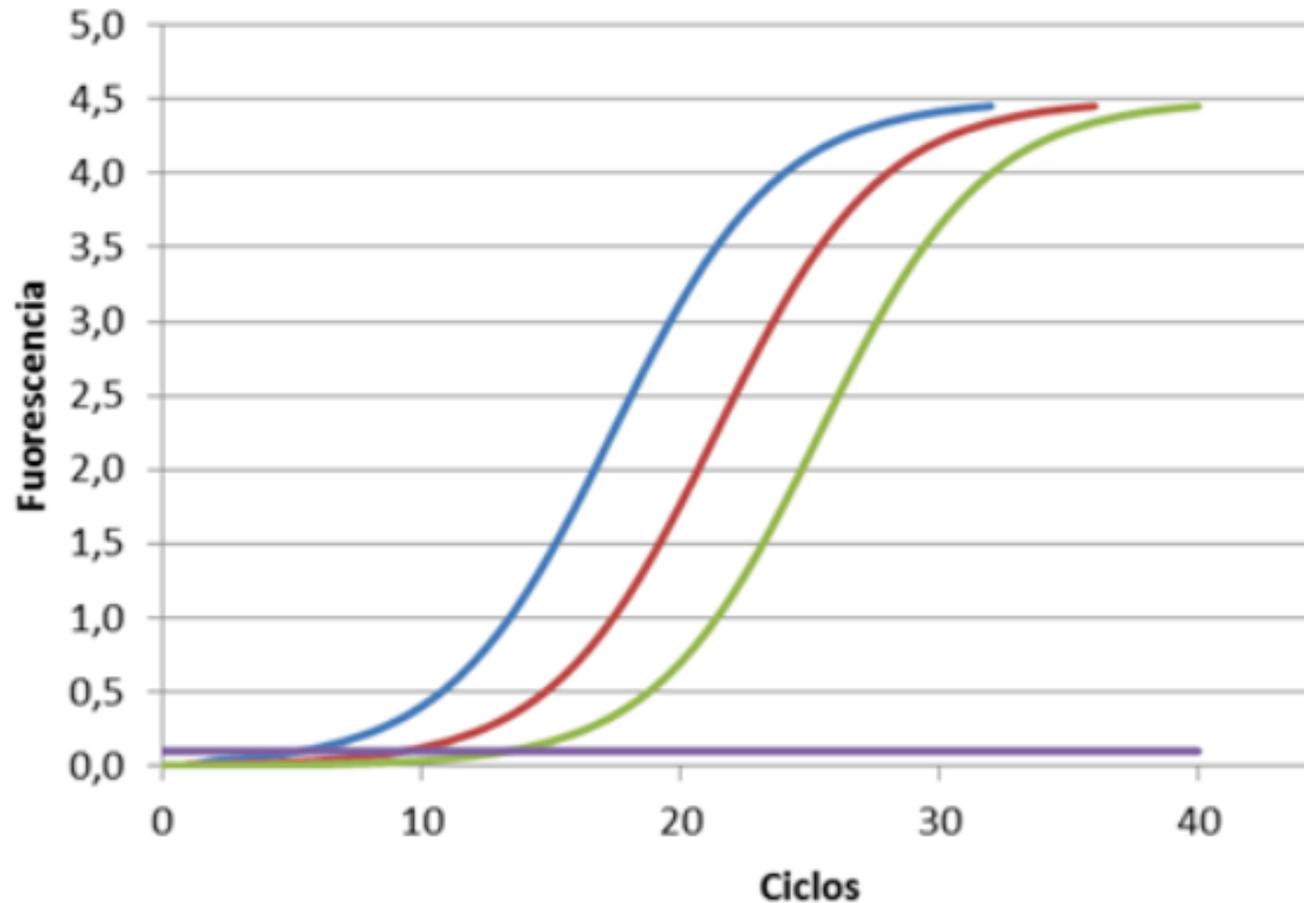
- Umbral: indica la detección del analito de interés.
- Esta determinado por el límite de detección.
- Nos da una idea de la sensibilidad del ensayo.

Límite de detección o LOD

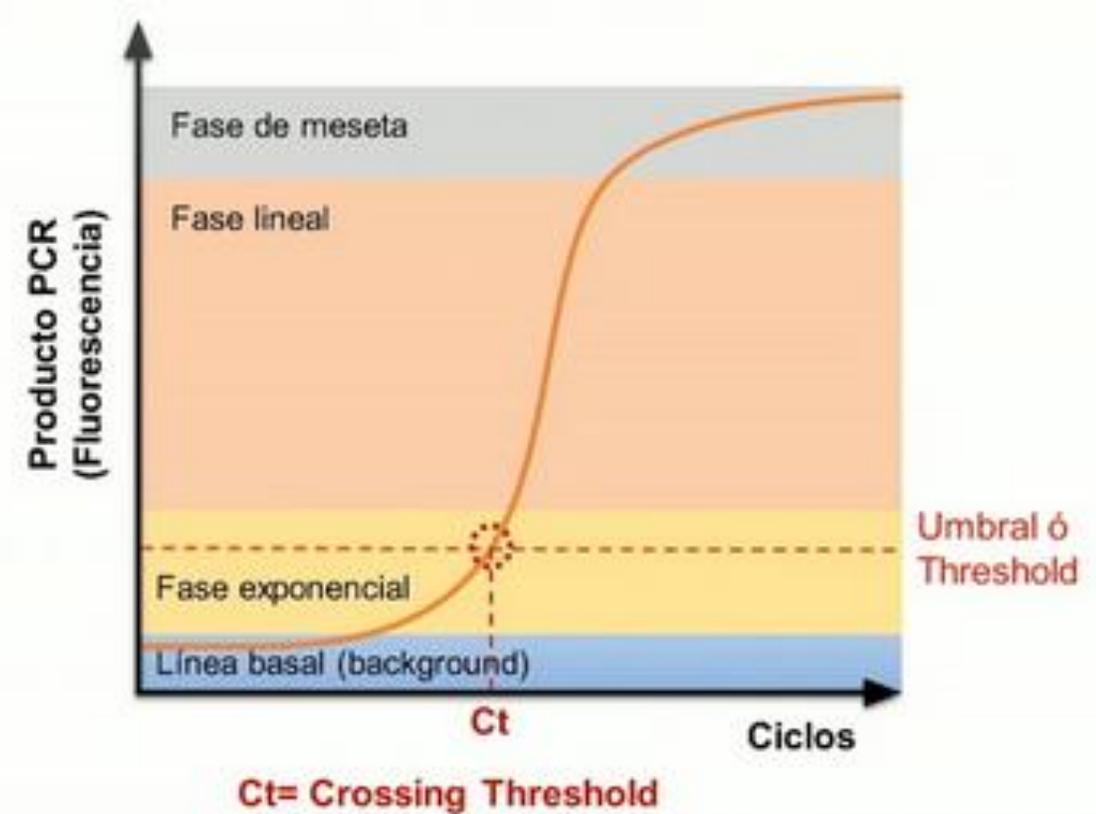


% Pacientes no detectados (FN)

Detección de SARS CoV-2



— Concentración alta — Concentración media
— Concentración baja — Ausencia



Ct= Crossing Threshold

Ct: n° de ciclos en que la señal de fluorescencia cruza ese umbral



@congreso.cnb

Límite de detección o LOD

El Límite de detección (LoD), es la mínima concentración del gen en estudio que puede ser detectado al menos en un 95% de las mediciones



LOD: forma práctica



Se mezclan dos muestras en proporciones definidas

- Blanco: no hay detección
- muestra de concentración conocida
- se diluyen hasta que 95% de los resultados sean positivos



Requisito de CAP – Información del inserto

Non-clinical performance evaluation

Key performance characteristics

Analytical sensitivity

Limit of detection (LoD) studies determine the lowest detectable concentration of SARS-CoV-2 at which greater or equal to 95% of all (true positive) replicates test positive.

To determine the LoD, a cultured virus of an isolate from a US patient (USA-WA1/2020, catalog number NR-52281, lot number 70033175, $2.8E+05$ TCID₅₀/mL¹) was serially diluted in simulated clinical matrix. A total of 7 concentration levels, with 3-fold serial dilutions between the levels, were tested with a total of 21 replicates per concentration, with an additional 10 replicates of a blank sample (i.e., simulated clinical matrix).

As shown in Table 15, the concentration level with observed hit rates greater than or equal to 95% were 0.009 and 0.003 TCID₅₀/mL for SARS-CoV-2 (Target 1) and pan-Sarbecovirus (Target 2), respectively. As shown in Table 16, the Probit predicted 95% hit rates were 0.007 and 0.004 TCID₅₀/mL for SARS-CoV-2 (Target 1) and pan-Sarbecovirus (Target 2), respectively.



Límite de detección o LOD

| Nombre del estándar | Número de referencia | N° Lote | Concentración (copias gen/mL) |
|--|----------------------|----------|-------------------------------|
| SARS-COV-2, Aislado USA- WA1/2020 gamma-irradiado | NR-52287 | 70048202 | 1,05x10 ⁹ |



Sensibilidad y especificidad diagnóstica

Método de referencia

Método de prueba

| | | ENFERMO | SANO | |
|--|----------|--------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| Resultado de la prueba diagnóstica que evaluamos | POSITIVO | VP a | FP b | Total positivos a+b |
| | NEGATIVO | FN c | VN d | Total negativos c+d |
| | | Total de enfermos a+c | Total de sanos b+d | TOTAL INDIVIDUOS a+b+c+d |

Verdaderos positivos. Resultados positivos en sujetos enfermos.

Verdaderos negativos. Resultados negativos en sujetos sanos.

Falsos positivos. Resultados positivos en sujetos sanos.

Falsos negativos. Resultados negativos en sujetos enfermos.



Comparación de resultados: método nuevo vs. método presente

| Muestra numero | Método presente (referencia) | Método nuevo |
|----------------|------------------------------|--------------|
| 001 | Positivo | Positivo |
| 002 | Negativo | Negativo |
| 003 | Positivo | Positivo |
| 004 | Positivo | Positivo |
| 005 | Positivo | Positivo |
| 006 | Negativo | Negativo |
| 007 | Negativo | Negativo |



Sensibilidad: Tabla de contingencia 2x2

| | | Metodo de referencia (actual) | | |
|--------------|----------|-------------------------------|----------|-------|
| | | Positivo | Negativo | Total |
| Metodo nuevo | Positivo | 47 | 0 | 47 |
| | Negativo | 0 | 28 | 28 |
| | Total | 47 | 28 | 75 |

Sensibilidad: $100 * VP / (VP + VN)$

% Sensibilidad: $\frac{100 * 47}{(47 + 0)} = 100\%$

Sensibilidad: 100% (IC al 95% = 92,3 – 100 %)



Especificidad: Tabla de contingencia 2x2

| | | Metodo de referencia (actual) | | |
|--------------|----------|-------------------------------|----------|-------|
| | | Positivo | Negativo | Total |
| Metodo nuevo | Positivo | 47 | 0 | 47 |
| | Negativo | 0 | 28 | 28 |
| | Total | 47 | 28 | 75 |

Especificidad: $100 * VN / (FP + VN)$

% Especificidad: $\frac{100 * 28}{(0 + 28)} = 100\%$

Especificidad: 100% (IC al 95% = 87,9 – 100 %)



Resumen: Métodos cualitativos

- Límite de detección: se verifica el LOD descrito por el fabricante (blanco + concentración conocida en el umbral)
- Sensibilidad clínica: tabla 2x2
Sensibilidad: $100 * VP / (VP + VN)$
- Especificidad clínica: tabla 2x2
Especificidad: $100 * VN / (FP + VN)$



¡Gracias!



veronica.luzzi@tricore.org

veronica.luzzi@gmail.com

