



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO. División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Formato SS-1
**SOLICITUD DE TÉRMINO
DE SERVICIO SOCIAL**

Mtra. María Elena Contreras Garfias
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
PRESENTE

Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
	26	10	2020				

Datos del Alumno

Nombre : Leslie Nayeli Lara Orospe	
Matricula : 2143024991	Licenciatura : Química Farmacéutica Biológica
Domicilio : Carlota Armero Edif. 7B Int. 202 CTM Culhuacán Sección VI	
Teléfono : 56569392	Celular : 5618806807
Correo Electrónico : leslie_lara_23@hotmail.com	CURP : LAOL960923MMCRRS06

Datos del Proyecto

Nombre del Proyecto : Verificación del sistema de medición CAPILLARYS II FLEX PIERCING en el Laboratorio Central de Análisis Clínicos del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez							
Lugar donde se realizó el Servicio Social : Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez							
Dependencia : Federal							
Entidad Federativa : Distrito Federal							
Municipio : Tlalpan	Localidad : CDMX						
Fecha de Inicio	Día	Mes	Año	Fecha de Término	Día	Mes	Año
	19	8	2020		19	2	2020

PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES

Sector: 3.- Público Tipo: 1.- Externo
Orientación: 8.- Salud, Alimentación Y Nutrición

FIRMAS

de Lipo
Felipe Mendoza Pérez 07183
Asesor Interno
Nombre, firma y No. Económico

de Lipo
Leslie Nayeli Lara Orospe
Alumno
Nombre, firma

de Lipo
Claudia Tavera Alonso 1317039
Asesor Externo
Nombre, firma y No. Económico

de Lipo
Felipe Mendoza Pérez
Vo. Bo. de la Comisión
Nombre y firma de la persona que autoriza



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez
Renacimiento de la excelencia

"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

Ciudad de México 20 de noviembre de 2020.
INCAR-DG-DE-SE-351-2020.

DR. JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS
UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA-XOCHIMILCO
PRESENTE.

La Subdirección de Coordinación de la Enseñanza hace constar que el alumno (a) **LARA OROSPE LESLIE NAYELI** con número de matrícula **2143024991**, pasante de la Carrera en Química Farmacéutica Biológica, procedente de la Universidad Autónoma Metropolitana, finalizó satisfactoriamente su **SERVICIO SOCIAL** en este Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, durante el período del **19 de agosto de 2019 al 19 de febrero de 2020**, participando en el protocolo **"VERIFICACIÓN DEL SISTEMA DE MEDICIÓN CAPILLARYS II FLEX PIERCING"**, bajo la tutoría de (el/la) M.A.O.S. Claudia Tavera Alonso, Jefe en (el/la) Servicio del Laboratorio Central de este Instituto.

Atentamente,

DR. SERGIO A. TREVETHAN CRAVIOTO
SUBDIRECTOR DE COORDINACIÓN DE LA ENSEÑANZA



C.c.p.- M.A.O.S. Claudia Tavera Alonso.- Jefe del Servicio del Laboratorio Central del INCICH

Juan Badiano 1, Col. Sección XVI, Alcaldía Tlalpan, C.P. 14080,
Ciudad de México
Tel.: 555573-2311 ext. 24202, 24203



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez
Renacimiento de la excelencia

"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"


Ciudad de México a 26 de octubre del 2020.

DR. JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO
JEFE DE DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS
Presente.

Por medio de la presente informo a Usted que la C. Leslie Nayeli Lara Orospe con número de matrícula 2143024991 de la Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica, ha concluido satisfactoriamente su Servicio Social en el Laboratorio Central del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez con el proyecto: "Verificación del sistema de medición CAPILLARYS II Flex Piercing" en el período comprendido del 19 de agosto del 2019 al 19 de febrero del 2020 cubriendo un horario de 7:00 a 13:00 hrs, dando un total de 480 horas.

Sin otro particular de momento, quedo a sus órdenes para cualquier

ATENTAMENTE,


M.A.O.S. Claudia Tavera Alonso
Jefe de Servicio de Laboratorio Central
Ced. Prof. 1317039

Ciudad de México, 10 de Diciembre de 2020.

Dr. Juan Esteban Barranco Florido

JEFE DE DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

Presente.

Por medio de la presente informo a usted que la alumna Leslie Nayeli Lara Orospe con número de matrícula 2143024991 de la Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica, ha concluido satisfactoriamente su servicio social en el Laboratorio Central de Análisis Clínicos del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez con el proyecto: Verificación del sistema de medición CAPILLARYS II Flex Piercing, en el periodo del 19 de Agosto de 2019 al 19 de Febrero de 2020, de lunes a viernes de 07:00 a 13:00 h cubriendo un total de 480 horas.

Sin otro particular de momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Felipe Mendoza Pérez

No. Económico: 07183



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Xochimilco

**UNIDAD XOCHIMILCO DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE
LA SALUD**

Alumna: Leslie Nayeli Lara Orospe

Matrícula: 2143024991

Licenciatura: Química Farmacéutica Biológica

Proyecto genérico: Evaluación de productos relacionados con la
salud

Etapas: Desarrollo de métodos y técnicas analíticas para el control físico, químico,
biológico y o microbiológico de productos relacionados con la salud.

Informe del Servicio Social

**Verificación del sistema de medición CAPILLARYS II FLEX
PIERCING en el Laboratorio Central de Análisis Clínicos del
Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez**

Lugar de realización: Instituto Nacional de Cardiología

Asesor interno: Felipe Mendoza Pérez

Asesor externo: Claudia Tavera Alonso

Fecha de inicio: 19 de Agosto de 2019

Fecha término: 19 de Febrero de 2020

INDICE

Antecedentes.....	1
Objetivos.....	4
Marco teórico.....	5
Diabetes.....	5
Hemoglobina glicada (HbA1c).....	5
¿Cómo se relaciona la HbA1c con la diabetes?.....	6
Metodología disponible para la determinación de la HbA1c.....	6
Métodos basados en la diferencia de la carga eléctrica entre la hemoglobina glicada y la hemoglobina no-glicada.....	6
Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico emitido por la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA).....	8
Validación.....	9
Etapas de la Validación.....	9
Proceso de calificación de instrumentos analíticos.....	9
Calificación de Diseño (CD)	10
Calificación de Instalación (CI).....	11
Calificación de Operación (CO).....	11
Calificación de Desempeño (C de D).....	12
Verificación.....	12
Verificación de los parámetros de desempeño de los procedimientos de examen.....	13
Linealidad.....	13
Precisión.....	13
Veracidad.....	13
Incertidumbre de medición.....	14

Correlación.....	14
Metodología.....	15
Evaluación de la linealidad.....	15
Evaluación de la precisión.....	17
Evaluación de la veracidad.....	17
Correlación.....	18
Resultado y análisis de resultados.....	19
Linealidad.....	19
Precisión.....	21
Veracidad.....	22
Correlación.....	23
Discusión.....	26
Conclusión.....	28
Bibliografía.....	29
Resumen.....	33

Verificación del sistema de medición CAPILLARYS II Flex Piercing en el Laboratorio Central de Análisis Clínicos del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

ANTECEDENTES

El laboratorio clínico es el espacio físico donde se efectúan una gran diversidad de procedimientos médicos, científicos, técnicos, etc., que en conjunto representan un valioso recurso de la clínica al documentar el estado de salud (medicina preventiva) o de enfermedad (medicina curativa). Existe una única razón por la que el médico envía la muestra al laboratorio y esta es que necesita información para tomar decisiones adecuadas; ya que el clínico solo observa en el paciente una serie de manifestaciones clínicas, como signos o síntomas que no puede cuantificar por lo que deben ser traducidos a datos concretos. (Terres, 2009)

El laboratorio clínico ayuda al médico en cualquier momento y en cualquier etapa de la evaluación clínica ya sea para detectar una enfermedad, al confirmar un diagnóstico o al evaluar el tratamiento. (Terres, 2009)

La correlación de los resultados de laboratorio, junto con los del historial clínico del paciente permiten al clínico llegar a un diagnóstico más acertado, y tomar en cuenta las diferentes variables, para adoptar la mejor terapia de respuesta a lo que afecta al paciente (Messeguer et. al, 1992).

En México existe un programa de acreditación de hospitales, los laboratorios clínicos que se encuentran en los mismos, realizan las revisiones de calidad cuando los hospitales en donde están ubicados son revisados. Existen también muchos laboratorios independientes de los hospitalarios que voluntariamente participan en el proceso de acreditación a través de diferentes organismos.

La Entidad Mexicana de Acreditación (EMA), es la primera entidad de gestión privada en México, que tiene como objetivo acreditar a los Organismos de la Evaluación de la Conformidad que son los laboratorios de ensayo, laboratorios de calibración, laboratorios clínicos, entre otros. Desde enero de 2006, la EMA, cumple con la norma vigente para organismos de acreditación en el ámbito mundial, la Norma NMX-EC-17011-IMNC-2005 "Evaluación de la Conformidad: requisitos generales para los organismos que realizan la acreditación de Organismos de Evaluación de la Conformidad". (EMA)

La acreditación es el procedimiento mediante el cual, un organismo autorizado evalúa y declara formalmente que un laboratorio es técnicamente competente para la realización de un ensayo o grupo de ensayos determinados. (ENAC, 2012)

El Laboratorio Central de Análisis Clínicos del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" obtuvo la acreditación por la EMA bajo la Norma NMX-EC-15189-IMNC-2015 / ISO 15189:2012 "Laboratorios clínicos, requisitos de la calidad y competencia" en octubre

de 2018 por lo que se ha hecho necesario cumplir estrictos parámetros de calidad para incrementar la confianza en los resultados de análisis emitidos.

El desarrollar y llevar a cabo un programa de control de calidad es importante en la implementación de las buenas prácticas de laboratorio, ya que los servicios de un laboratorio clínico son los que controlan cerca del 80% de las decisiones clínicas, desde el diagnóstico y la terapia, hasta el pronóstico. La garantía total de la calidad implica al Aseguramiento de la Calidad, la Mejoría Continua de la Calidad y los Programas de Control de Calidad, por lo que se deben considerar tres aspectos importantes de la garantía total de la calidad y que en particular tienen que ver con la preparación de la muestra, la utilidad clínica e interpretación de los resultados, la bioseguridad y el buen manejo de los desechos. También se debe supervisar el desempeño de los laboratorios, donde el Control de Calidad Interno y Externo son parte fundamental del proceso y donde la participación en programas de evaluación externa de la calidad es requisito indispensable para la acreditación. (Williams, 2006)

Para mejorar la calidad de un laboratorio clínico, se deben implementar políticas y procedimientos elaborando un manual de calidad, que debe incluir tres aspectos fundamentales: la fase pre-examen, examen y post-examen. También debe cumplir con las regulaciones, tanto locales como nacionales e internacionales, donde los programas de seguimiento (programas de evaluación externa), las pre-evaluaciones, las evaluaciones y la acreditación, sirvan para llevar a cabo este proceso.

El control de calidad es un mecanismo diseñado para detectar y corregir posibles deficiencias analíticas internas antes de emitir un resultado. La calificación es la acción de comprobar y documentar, a través de la planificación, ejecución y registro de pruebas, que cualquier área, sistema y equipo está instalado apropiadamente, y/o funciona correctamente y conduce a los resultados esperados. La calificación es a menudo una parte de la validación (etapa inicial), pero los pasos individuales de la calificación por sí solos no constituyen el proceso de validación (Khazam, 2015). El proceso de calificación debe ser un proceso sistemático y debe comenzar desde la fase de diseño de las instalaciones, equipos y servicios (Instituto de Salud Pública de Chile, 2010).

La calificación forma parte de las evidencias que aseguran que un proceso permanece en el plano de validez. Un equipo o sistema se califica de acuerdo con especificaciones siguiendo las normas nacionales e internacionales, donde los resultados obtenidos proveen información para la calificación de diseño, instalación, operación y desempeño. (Cardona, 2013). A la par, la calificación implica también la organización, prevención de problemas, seguridad, decremento de los costos por reparaciones, incluyendo también la confiabilidad de las mediciones a los equipos del proceso productivo.

En el laboratorio, se utilizan herramientas estadísticas de control que surgen de la planificación del control de calidad interno (CCI). Para llegar a dicha planificación se deben tener conocimientos acerca del desempeño de los métodos en las condiciones de trabajo del laboratorio (Burtis, 2006). El fabricante de reactivos incorpora en las especificaciones técnicas el desempeño del método, el cual ha sido evaluado con

protocolos de validación aceptados internacionalmente. Estas especificaciones muchas veces no pueden reproducirse en el laboratorio de rutina ya que hay una variabilidad intrínseca que depende del equipo, del operador, de las condiciones de trabajo, y también de los protocolos de evaluación de métodos empleados por el fabricante para el establecimiento de dichas metas (Krouwer, 2002). Con los datos de desempeño del método se obtienen estadísticos como el coeficiente de variación (CV), con el cual se evalúa la imprecisión o error aleatorio, y el sesgo, que mide la veracidad o error sistemático; con ambos parámetros se puede calcular el error total del método en el laboratorio (ETL) el que es cotejado con el error total permitido elegido (ETP) de distintas fuentes disponibles (CLIA'88, Variabilidad Biológica, RCPA, etc.) (Westgard, 1995). Con estos datos se puede llevar a cabo una correcta planificación del CCI y un seguimiento de forma continua a través de parámetros de desempeño tales como el error total, presupuesto de error y six-sigma.

Planificar el CCI es fundamental para la mejora continua sobre el cual se asienta el desarrollo de los requisitos técnicos en un laboratorio de análisis clínicos; esto permite obtener seguridad y confiabilidad analítica en los resultados. El CCI es importante para detectar errores, así como en el monitoreo de la estabilidad y desempeño del sistema de medición. En este sentido, la participación en programas de evaluación externa de la calidad permite establecer comportamientos y tendencias de las mediciones realizadas, y de esta manera obtener un aseguramiento de la calidad de las mismas.

El Laboratorio Central de Análisis Clínicos del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez considera de gran valor e importancia la verificación del analizador CAPILLARYS II Flex Piercing utilizando los parámetros de linealidad, precisión y veracidad para obtener resultados de análisis confiables y seguros de hemoglobina glicada (HbA1c) así como la evaluación comparativa entre resultados de este analito obtenidos a partir de dos metodologías diferentes: electroforesis capilar y método de inmunoinhibición turbidimétrica realizados en los equipos CAPILLARYS II Flex Piercing y AU480 de Beckman Coulter respectivamente, con el propósito de estimar los errores sistemáticos sobre la base de las diferencias observadas y así establecer el método potencialmente más útil para mejorar el desempeño analítico.

OBJETIVOS

General:

Verificar el sistema de medición CAPILLARYS II Flex Piercing en el Laboratorio Central de Análisis Clínicos del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez para obtener resultados de análisis confiables y seguros de hemoglobina glicada (HbA1c).

Específicos:

1. Realizar la verificación de métodos del sistema (HbA1c) con base en la Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico emitido por la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA).
2. Evaluar el desempeño del método con el fin de demostrar que cumple con los requisitos especificados utilizando los parámetros de linealidad, precisión y veracidad.
3. Determinar la correlación de dos metodologías de HbA1c por inmunoinhibición turbidimétrica en Beckman Coulter AU480 y electroforesis capilar en CAPILLARYS II Flex Piercing.

MARCO TEÓRICO

Diabetes y la hemoglobina glicada (HbA1c)

Diabetes

La diabetes es una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. El efecto de la diabetes no controlada es la hiperglucemia (aumento del azúcar en la sangre) (OMS, 2018). A largo plazo se asocia con daño, disfunción o falla de varios órganos, especialmente los ojos, los riñones, el sistema nervioso, el corazón y los vasos sanguíneos. (American Diabetes Association, 2014)

La diabetes se clasifica en cuatro grupos:

- Diabetes tipo 1: resultante de la destrucción de las células β del páncreas, usualmente llevando a una deficiencia absoluta de insulina, la mayoría de ellas de origen autoinmune.
- Diabetes tipo 2: resultante de un defecto progresivo de la secreción de insulina, en el contexto de resistencia gradual a la insulina.
- Otros tipos de diabetes debidos a defectos genéticos en la función de las células β del páncreas, defectos genéticos en la acción de la insulina, enfermedades exocrinas del páncreas como la fibrosis quística, y la diabetes inducida por drogas o químicos, entre otros.
- Diabetes gestacional: la que se diagnostica en el curso del embarazo. (Campuzano, et. al, 2010)

En el mundo hay más de 415 millones de personas con diabetes, para 2040, esta cifra habrá aumentado hasta alcanzar los 642 millones. (Federación Internacional de Diabetes, 2015).

El 77% de las personas que sufren esta enfermedad viven en países de ingresos bajos y medios. México ocupa el 6to lugar mundial en número de personas con diabetes. (Federación Internacional de Diabetes, 2015).

Hemoglobina glicada (HbA1c)

De acuerdo con la definición de la International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), la hemoglobina glicada, más conocida como HbA1c es un término que se refiere a un grupo de sustancias que se forman a partir de reacciones bioquímicas entre la hemoglobina A (HbA) y algunos azúcares presentes en la circulación sanguínea. (Jeppsson, et. al, 2002)

En condiciones normales el eritrocito vive en la circulación un promedio de 120 días y el mayor componente de este es la hemoglobina. La hemoglobina está formada por dos dímeros de globina que en el adulto corresponden a la HbA, que representa más del 97% de la hemoglobina total, a la HbA2 que comprende menos del 2.5% y a la hemoglobina fetal (HbF) que representa menos del 1% de la cantidad de hemoglobina del adulto (Jeppsson, et. al, 2002).

El contacto permanente del eritrocito con otras sustancias, en particular con azúcares como la glucosa, hace que ésta las incorpore a su estructura molecular proporcionalmente con la concentración de estas sustancias en el torrente sanguíneo y durante el lapso de vida de la célula. (Campuzano, et. al, 2010)

En el caso de la HbA1c, como se ha mencionado, la HbA constituye el 97% de la hemoglobina del adulto (estado que se alcanza a partir del primer año de vida), a través de los mecanismos de glicación, parte de la HbA se convierte en HbA1 y dependiendo del azúcar que incorpore en sus diferentes formas, conocidas como hemoglobinas rápidas, por ser las que primero eluden en los procesos de cromatografía usados para identificarlas, HbA1a, HbA1b y HbA1c, siendo esta última el principal componente (aproximadamente el 80 % de la HbA1).(Campuzano, et. al, 2010)

Como resultado de las diferentes reacciones de glicación, la HbA, finalmente se subdivide en dos grandes grupos: la HbA1 que corresponde a la hemoglobina que ha sido fruto de la glicación no-enzimática y la Hb0 (hemoglobina cero) que corresponde la fracción no glicada. (Campuzano, et. al, 2010)

¿Cómo se relaciona la HbA1c con la diabetes?

Hay una relación directa entre el porcentaje de la HbA1c y el promedio de glucosa sérica porque la glicación de la hemoglobina es un proceso relativamente lento, no-enzimático, que sucede durante los 120 días de la vida media del eritrocito y que termina en la glicación irreversible de la hemoglobina de los glóbulos rojos hasta su muerte, por lo que la HbA1c refleja la glucemia media del individuo en los tres a cuatro meses previos a la toma de la muestra (Peterson et. al, 1998). Bunn y colaboradores en 1976, informaron que en los pacientes diabéticos el incremento en el porcentaje de la HbA1c es significativamente mayor que en los individuos sanos (Bunn et. al, 1976).

Metodología disponible para la determinación de la HbA1c

En la práctica, definir con cual método y con qué reactivos trabajar depende de muchos factores, en donde el factor más importante es el desempeño analítico (resultados precisos y exactos) sobre el menor precio, como infortunadamente se presenta en el medio, en donde se le da prioridad al menor costo.

Los métodos para medir la hemoglobina glicada se basan en diferencias en las moléculas de la hemoglobina glicada y la hemoglobina no-glicada, ya sean físicas, químicas o inmunológicas entre la fracción glicada, la HbA1 o sus fracciones como la HbA1c, y la fracción de la Hb0 (la fracción no-glicada).

Métodos basados en la diferencia de la carga eléctrica entre la hemoglobina glicada y la hemoglobina no-glicada

El principio se basa en el hecho de que la unión de glucosa en el caso de la HbA1c, o de otro azúcar, como puede ser la HbA1a o la HbA1b, a un amino terminal de las cadenas β de la HbA altera la carga total de la hemoglobina, haciendo que la fracción de

hemoglobina glicada (Hb1) migre en forma diferente, usualmente más rápido, a la hemoglobina no-glicada (Hb0) cuando se pone en un campo eléctrico como sucede en los métodos electroforéticos, permitiendo de esta manera separar las dos fracciones.

Métodos electroforéticos

Se basan en el hecho de que la molécula de HbA1c es diferente a la molécula de la HbA y esta característica hace que puesta la sangre en una corriente se desplace de acuerdo con sus características físico-químicas relacionadas con las cargas eléctricas.

El sistema de medición CAPILLARYS 2 Flex Piercing utiliza el principio de electroforesis capilar en solución libre. Permite la separación de moléculas cargadas en función de su movilidad electroforética propia en un tampón de un pH dado y según el pH del electrolito, de un flujo electroendosmótico.

El equipo posee una serie de capilares de sílice fundido en paralelo, permitiendo realizar 8 análisis simultáneos para la cuantificación de la fracción HbA1c a partir de sangre total. La inyección en los capilares de la muestra diluida con la solución hemolizante se realiza en el ánodo por aspiración. La separación se realiza a continuación aplicando una diferencia de potencial de varios miles de voltios en los extremos de cada capilar.

La detección directa de las hemoglobinas se efectúa en el lado catódico a 415 nm, que es la longitud de onda de absorción específica de las hemoglobinas; permite una cuantificación precisa de la fracción HbA1c de la hemoglobina. (SEBIA, 2012)

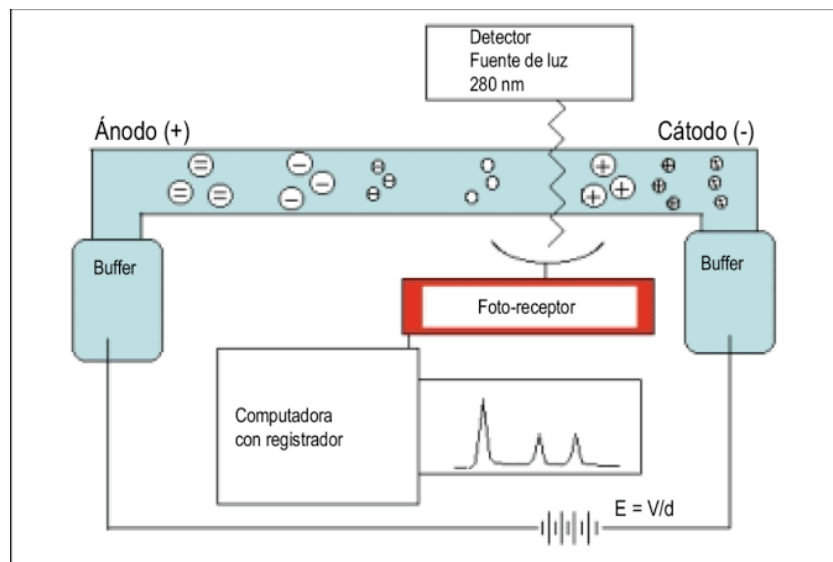


Figura 1. Determinación de HbA1c por electroforesis capilar.

Métodos inmunológicos

Los métodos inmunológicos utilizan anticuerpos contra una secuencia de aminoácidos que varían de 3 a 8 de la fracción N-terminal de la hemoglobina glicada. Tienen como ventaja el que son específicos contra la HbA1c y pueden ser incorporados a los autoanalizadores de química clínica ya sea por métodos de inmunoturbidimetría, o de inmunoanálisis enzimático en donde se utiliza una proteasa para digerir la hemoglobina y producir fructosil-aminoácido que por la acción de una oxidasa produce peróxido de hidrógeno. (Beckman Coulter, 2019)

El sistema de medición AU 480 de Beckman Coulter determina por inmunoturbidimetría la HbA1c. En la determinación por esta técnica se cuantifican tanto la hemoglobina total como la HbA1c. Para la cuantificación de la hemoglobina total se hemoliza la muestra y la solución se somete a un búfer alcalino de un detergente no iónico, convirtiendo la hemoglobina en hematina y estabilizando la molécula. La hematina torna la solución de un color verde, que es cuantificado a una longitud de onda de 604 nm. Para la cuantificación de la HbA1c igualmente se debe hemolizar la muestra y se procede con dos pasos elementales:

- 1) la solución es incubada con micropartículas cubiertas con anticuerpos específicos dirigidos contra la HbA1c; en esta reacción se une un solo anticuerpo a cada sitio de glicación presente en la hemoglobina.

- 2) Una vez terminado este paso, se introduce en la solución un hapteno aglutinante que posee varios sitios inmunoreactivos, que unirá las micropartículas con anticuerpos que han quedado libres; en este paso se pueden unir varios anticuerpos a una sola molécula de haptenos y darse el fenómeno de aglutinación. La determinación requiere de la cuantificación de la turbidez de la suspensión a una longitud de onda de 700 nm. En este sentido a mayor aglutinación, mayor cantidad de anticuerpos libres y menor concentración de HbA1c disponible para unir las micropartículas a los anticuerpos, lo anterior como consecuencia de que la HbA1c compite con el hapteno por la unión del anticuerpo. (Campuzano, et. al, 2010)

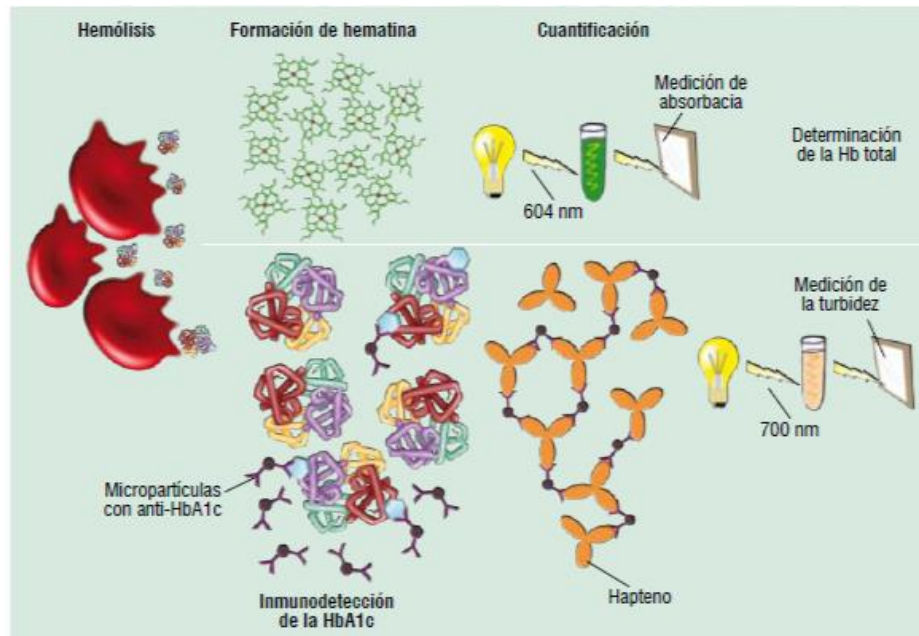


Figura 2. Determinación de HbA1c por inmunoturbidimetría.

Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico emitido por la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA)

El objetivo de esta guía es establecer las directrices para llevar a cabo la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos que se realizan en el laboratorio clínico. (EMA, 2008)

Esta guía la deben aplicar los laboratorios clínicos que se encuentren en alguna etapa del proceso de acreditación ante la EMA, a todos los procedimientos de examen cuantitativos del alcance de la acreditación, aun cuando dichos procedimientos ya estén implementados previamente en el laboratorio, así como, cada vez que se cambie, modifique o se implemente un método de examen. (EMA, 2008)

Describe los puntos que se deben considerar para la validación y verificación de los procedimientos de examen cuantitativos que se realizan en un laboratorio clínico, con base en especificaciones que menciona la Norma Internacional ISO 15189:2012 (NMX-EC-15189-IMNC-2015).

Validación

La validación comprueba la aptitud de los procedimientos de examen y refleja las condiciones reales de la aplicación de estos. Los datos de esta validación los informa el fabricante en los instructivos de uso de los reactivos. Sin embargo, el laboratorio debe verificar que puede aplicar correctamente los métodos ya validados por el fabricante bajo

sus condiciones propias de operación (equipo, calibradores, analistas, etc.) generando evidencias objetivas, para confirmar su aplicación correcta. (EMA, 2008)

Etapas de la Validación

- Pre- requisitos de la Calificación.
- Calificación de Sistemas Críticos.
- Calificación de Equipos.
- Validación de Métodos Analíticos.
- Validación de Procesos.
- Validación de Limpiezas.
- Validación de Software.
- Calificación de Personal.

La validación de los procesos y sistemas es esencial para que un laboratorio pueda establecer plena confianza de que los productos fabricados cumplen con las especificaciones para los que fueron diseñados. Los estudios de validación son aplicables a: pruebas analíticas, equipos, sistemas y servicios. Un proceso debe validarse cuando sus resultados no puedan verificarse completamente a través de mecanismos de inspección o pruebas. En la validación de procesos, métodos o sistemas, los equipos requieren ser calificados. (Roso, 2015)

Proceso de calificación de instrumentos analíticos

La calificación es la acción de comprobar y documentar que cualquier instalación, sistema y equipo está instalado apropiadamente y funciona correctamente conduciendo así a los resultados esperados. La calificación es a menudo una parte (etapa inicial) de la validación, pero los pasos individuales de calificación por sí solos no constituyen el proceso de validación. (Moyano, 2012)

El proceso de calificación del equipo de instrumentos analíticos (CEIMA) debe establecer que la especificación operacional del instrumento es apropiada para su propósito establecido y que el instrumento se desempeña de acuerdo con esa especificación. La CEIMA también debe establecer que un equipo es y será conservado en un estado de mantenimiento y calibración consistente con su uso. (CENAM, 2012)

El proceso de CEIMA está basado en cuatro etapas de calificación:

- Calificación de Diseño (CD)
- Calificación de Instalación (CI)
- Calificación de Operación (CO)
- Calificación de Desempeño (C de D).

La aplicación de cada etapa de la CEIMA, varía durante el tiempo de vida de un equipo. Las cuatro etapas son aplicables desde la compra de un equipo nuevo. Puede ser necesario que los aspectos de CD y CI sean efectuados nuevamente cuando existan

cambios mayores en el instrumento. La CD y muchos aspectos de la CO, deben llevarse a cabo durante toda la vida del equipo y proporcionar una referencia contra la cual, el funcionamiento continuo del instrumento pueda ser evaluado. (CENAM, 2012)

1. Calificación de Diseño (CD)

La calificación del diseño tiene que ver, con lo que se requiere hacer con el instrumento, por lo que tiene que ser vinculado directamente al propósito de uso. La CD proporciona al usuario una oportunidad para demostrar que, en una etapa anticipada a la adquisición e instalación del instrumento se ha considerado el propósito de su uso y que la CD ha sido incorporada en el proceso de CEIMA. (CENAM, 2012)

En la CD se debe establecer el uso propuesto o probable del instrumento y definir las especificaciones operacionales y funcionales apropiadas.

La especificación operacional debe definir las características claves de desempeño del equipo, los intervalos sobre los cuales se requiere operar el instrumento y que se desempeñe consistentemente. (CENAM, 2012)

La especificación funcional debe considerar todos los requisitos del instrumento, incluyendo la especificación operacional y otros factores críticos relacionados con su uso, por ejemplo:

- a) Todas las exigencias del laboratorio
- b) La documentación relacionada al uso del instrumento (p.ej. documentación clara, manuales de operación fácil de usar, identificación por número de versión y fecha; protocolos para CI, CO y CD; procedimientos estándar de operación modelo POE, etc.)
- c) El nivel de habilidad requerida para operar el instrumento y los detalles de cualquier capacitación necesaria y cursos proporcionados por el proveedor.
- d) Rendimiento de muestra, presentación y necesidades para su introducción.
- e) Necesidades de adquisición de datos, forma de procesarlos y presentarlos.
- f) Condiciones ambientales o intervalo de condiciones dentro de las cuales, el instrumento debe trabajar.
- g) Sugerencias sobre los intervalos y los procedimientos para mantenimiento y calibración del instrumento, incluyendo el costo y la disponibilidad de cualquier contrato de servicio.
- h) El periodo en el cual, pueda garantizarse para el instrumento, el apoyo de calificación, mantenimiento, partes, etc.).
- j) Información sobre seguridad e higiene y asuntos o requisitos ambientales. (CENAM, 2012)

2. Calificación de Instalación (CI)

La calificación de instalación cubre toda la instalación del instrumento, incluyendo su respuesta a la aplicación inicial de energía, involucra la revisión formal para confirmar que el instrumento, sus módulos y accesorios se han suministrado como se solicitaron (de acuerdo a especificaciones establecidas entre el usuario y el proveedor) y que el instrumento es instalado adecuadamente en el ambiente que se seleccionó. La CI debe documentarse formalmente y debe cumplir lo siguiente:

- a) Que el instrumento (incluyendo todos los módulos y los accesorios) se hayan entregado como se solicitó (notas de entrega, orden de compra, especificaciones acordadas) y que el instrumento haya sido revisado y reportado sin daño.
- b) Que se proporcionó toda la documentación requerida y que es correcta (ej. manuales de operación, los cuales también deberán incluir su número y fecha de emisión, la especificación del proveedor y los detalles de todos los servicios y herramientas necesarias para operar el instrumento).
- c) Que se haya proporcionado el servicio recomendado, como el mantenimiento, los programas e intervalos de calibración y calificación.
- d) Que se hayan suministrado computadoras, microprocesadores, licencias y programas de cómputo de edición correcta.
- e) Que se haya proporcionado: la información sobre los consumibles necesarios empleados durante la operación normal del sistema del instrumento y los procedimientos de encendido y apagado.
- f) Que el ambiente seleccionado para el instrumento sea el adecuado, con un espacio apropiado para su instalación, operación, servicio y servicios adecuados (electricidad, gases especiales, etc.).
- g) Que haya sido proporcionada la información sobre seguridad e higiene y ambiente, relacionada a la operación del instrumento.

El éxito o la falla de cada una de las revisiones de la C I, deben ser registradas formalmente y los resultados de prueba de las revisiones de la CI que hayan sido realizadas por el proveedor, deben ser informadas al usuario. (CENAM, 2012)

3. Calificación de Operación (CO)

El propósito de la Calificación de Operación es demostrar y proporcionar evidencia documentada de que el instrumento funciona de acuerdo con la especificación operacional en el ambiente seleccionado.

Normalmente para un instrumento nuevo, la CO se realiza después de la CI o después de un cambio significativo en el instrumento o después de realizar un cambio de un componente resultado de una reparación o servicio. (CENAM, 2012)

4. Calificación de Desempeño (C de D)

La calificación del desempeño es la colección documentada de las actividades necesarias para demostrar que un instrumento se desempeña uniformemente de acuerdo con las especificaciones definidas por el usuario y es apropiado para el uso previsto después de haber efectuado las pruebas CI y CO, la calificación del desempeño demuestra la continua aptitud del instrumento para su uso previsto.

Debe incluir la verificación de las condiciones de operación del equipo en donde se planean pruebas que arrojen resultados que permitan visualizar y analizar estadísticamente los resultados para demostrar que el rango de operación establecido para el equipo puede ser utilizado para la obtención de productos de calidad. (Roso, 2015)

Control de Desempeño

Establecer una prueba o serie de pruebas para verificar el desempeño aceptable del instrumento para su uso previsto. Estas pruebas se basan por lo general en las aplicaciones típicas del instrumento en el sitio de uso y pueden consistir en el análisis estándares o componentes conocidos. Las pruebas se deben basar en métodos científicos y reflejar el uso general previsto para el instrumento. Algunas pruebas de aptitud del sistema o análisis con muestras control que se efectúa con comitentemente con las muestras de pruebas se pueden usar para demostrar que el instrumento se desempeña de manera adecuada. Las pruebas C de D pueden semejarse a las efectuadas durante la CO, pero las especificaciones para sus resultados se pueden fijar de manera diferente de ser necesario. Sin embargo, las especificaciones del usuario para las pruebas C de D deben demostrar que el instrumento funciona sin problemas para las aplicaciones previstas. Algunas pruebas de aptitud del sistema o análisis con muestras control que se efectúa con comitentemente con las muestras de prueba implica también que el instrumento se desempeña de manera adecuada. (Moyano, 2012)

Verificación

En el proceso de verificación de métodos se obtienen datos del rendimiento del sistema de medición en las condiciones de trabajo del laboratorio. Con los datos de desempeño del método se obtienen datos estadísticos como el coeficiente de variación, con el cual se evalúa la imprecisión o error aleatorio, y el sesgo, que mide la veracidad o error sistemático; con ambos parámetros se puede calcular el error total del método. Los datos obtenidos son utilizados para el seguimiento de las metodologías de análisis y para detectar pequeños desvíos y tendencias en el tiempo. De esta forma se puede anticipar una inestabilidad en el sistema de medición que pueda afectar la calidad de los resultados emitidos por el laboratorio. (Guglielmone, et. al, 2011)

El laboratorio debe realizar la verificación de los procedimientos de examen seleccionados antes de ponerlos en uso y comprobar si éstos cumplen con las características de desempeño en las condiciones del laboratorio. La verificación también se debe realizar cada vez que se realice un cambio mayor en algún procedimiento de examen que ya

hubiera sido verificado anteriormente. La verificación debe incluir los parámetros de linealidad, precisión, veracidad e incertidumbre. (EMA, 2008)

La realización de las actividades de verificación de los procedimientos de examen utilizados por el laboratorio debe cumplir con las necesidades metrológicas requeridas por el médico para un tratamiento adecuado del paciente. Un laboratorio clínico acreditado o en proceso de acreditación debe demostrar que tiene competencia técnica para realizar las actividades de validación y verificación de los procedimientos de examen cuantitativo establecidos en su alcance de acreditación. (EMA, 2008)

Verificación de los parámetros de desempeño de los procedimientos de examen

El laboratorio debe realizar la verificación de los procedimientos de examen seleccionados antes de ponerlos en uso y evidenciar si éstos cumplen con las características de desempeño en las condiciones del laboratorio. La verificación también se debe realizar cada vez que se realice un cambio mayor en algún procedimiento de examen que ya hubiera sido verificado anteriormente. Esta verificación debe incluir los siguientes parámetros:

- Linealidad (intervalo analítico)
- Precisión
- Veracidad
- Incertidumbre

Parámetros de desempeño

1. Linealidad

La capacidad (dentro de un intervalo dado) para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en las muestras de examen. El término linealidad aplicado a un método analítico, se refiere al tramo de concentraciones del analito en el que la respuesta del sistema de medición es una función lineal de la concentración; la representación gráfica de este tramo debe exhibir una buena correlación de los puntos experimentales a la recta de regresión para que el método analítico en cuestión sea aceptable. (NMX-CH-152-IMNC-2005)

2. Precisión

Grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos, utilizando una muestra homogénea, bajo condiciones establecidas. (Oficina de Acreditación, 2005)

3. Veracidad

Grado de concordancia existente entre la media aritmética de un gran número de resultados y el valor verdadero o aceptado como referencia (NMX-CH-5725-1-IMNC2006). Se relaciona con la presencia de errores de tipo sistemático, también llamado “sesgo” o

“desviación”; que puede expresarse como un valor absoluto o relativo al valor verdadero. (NMX-CH-152-IMNC-2005)

4. Incertidumbre de medición

Parámetro asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente, ser atribuidos al mensurando. (NMX-CH-152- IMNC-2005)

Correlación

La evaluación de la confiabilidad de las mediciones en un laboratorio clínico es de gran importancia para brindar un servicio de calidad.

Ante la aparición de nuevas metodologías o adaptaciones de técnicas conocidas, los laboratorios deben, previo a los cambios en los procedimientos, establecer el grado de acuerdo entre los métodos utilizados y los potencialmente más útiles para mejorar el desempeño analítico. El mejor camino para la investigación de la aplicabilidad de un método es su comparación entre las metodologías para el analito estudiado.

Una buena aproximación para estudiar la aplicabilidad de un método potencialmente utilizable es ensayar en paralelo muestras de pacientes por el nuevo método, en comparación con el que se está utilizando, con el objeto de estimar los errores sistemáticos sobre la base de las diferencias observadas.

Antes de cambiar algún procedimiento se debe estimar el grado de concordancia que existe entre ambos métodos. (Briozzo, et. al, 2007)

METODOLOGÍA

El laboratorio debe realizar la verificación de los procedimientos de examen seleccionados antes de ponerlos en uso y evidenciar si estos cumplen con las características de desempeño en las condiciones del laboratorio.

1. Evaluación de la Linealidad

Se prepararon disoluciones patrón en 5 niveles de concentración. Para preparar las disoluciones se emplearon muestras de pacientes en suero de baja, media y alta concentración analizadas en el laboratorio.

Una vez definidas las muestras a utilizar, la asignación final del valor fue obtenido calculando la media aritmética de un triplicado. Estos valores corresponden a la dilución 1 (concentración baja) y dilución 5. La preparación de las disoluciones patrón se realizaron de acuerdo con la siguiente tabla:

Tabla 1. Preparación de las diluciones

Número de dilución	Proporción en volumen de la muestra 1	Proporción en volumen de la muestra 2
1	Usar sin diluir	0
2	3	1
3	2	2
4	1	3
5	0	Usar sin diluir

Nota: Muestra 1: Concentración baja preferentemente cercana a cero.

Muestra 2: Concentración alta.

Se obtuvieron las medias de la concentración de acuerdo con la tabla 2:

Tabla 2. Diluciones respectivas

Número de dilución	Dilución de la muestra	Resultados de la concentración			Media
		1	2	3	
1	0%				
2	25%				
3	50%				
4	75%				
5	100%				

Se construyó una gráfica con la media aritmética de las réplicas sobre el eje Y, en función de la concentración sobre el eje X, posteriormente se calculó la ecuación de la recta para los puntos dados, así como el coeficiente de correlación.

Nota: Para concluir que la gráfica es lineal, esta debe de tener un coeficiente de correlación de por lo menos 0.99

- Verificación del intervalo reportable (intervalo validado)

Para la verificación del tamaño del intervalo reportable se tomaron los valores inferiores y superiores del intervalo lineal reportado por el fabricante y el intervalo verificado obtenido de la media de los valores de concentración de la tabla 2 y se llenó la siguiente tabla con la información solicitada:

Tabla 3. Verificación del intervalo reportable (intervalo validado)

	Valor inferior	Valor superior	Unidades	Tamaño del intervalo (Valor superior-valor inferior)	2/3 del intervalo del fabricante
Intervalo lineal reportado por el fabricante	4.00	14.70	%	Valor superior Intervalo lineal reportado por el fabricante - valor inferior Intervalo lineal reportado por el fabricante	(Resultado del Intervalo lineal reportado por el fabricante/3)*2
Intervalo verificado	4.20	13.77	%	Valor superior del intervalo verificado-valor inferior del intervalo verificado.	

Nota: Para que la verificación del tamaño del intervalo reportable sea aceptado, el intervalo verificado debe ser mayor o igual a 2/3 del intervalo verificado por el fabricante.

- Cálculo del sesgo y del % de error

Se llenó la columna 2 en la tabla 4 correspondiente a las medias obtenidas en la tabla 2, posteriormente se calcularon los valores teóricos de las abscisas (x), usando los valores extremos, posteriormente el sesgo (desviación) para cada nivel fue calculado por la diferencia del valor de la media de cada dilución y su valor teórico, finalmente el porcentaje de error se calculó dividiendo el sesgo (desviación) entre el valor teórico y el resultado fue multiplicado por 100.

Tabla 4. Cuantificación de errores en el intervalo reportable

No. de dilución	Media de los valores de concentración	Valor teórico	Sesgo (desviación)	% error
1	Ingresar valor medio	$(M1 \times 1) + (M2 \times 0)$	Y1-X1	$[(\text{sesgo1}) / x1) \times 100]$
2	Ingresar valor medio	$(M1 \times 0.75) + (M2 \times 0.25)$	Y2-X2	$[(\text{sesgo2}) / x2) \times 100]$
3	Ingresar valor medio	$(M1 \times 0.5) + (M2 \times 0.5)$	Y3-X3	$[(\text{sesgo3}) / x3) \times 100]$
4	Ingresar valor medio	$(M1 \times 0.25) + (M2 \times 0.75)$	Y4-X4	$[(\text{sesgo4}) / x4) \times 100]$
5	Ingresar valor medio	$(M1 \times 0) + (M2 \times 1)$	Y5-X5	$[(\text{sesgo5}) / x5) \times 100]$

Se comparó el sesgo (desviación) o el porcentaje de error para cada dilución con el criterio de aceptación utilizado (BV min bias) con un error total máximo de 5.00 % (los resultados obtenidos deben ser menores que el error total permitido: 2.50 %). Finalmente se tomó la decisión de aceptar o rechazar la prueba.

2. Evaluación de la precisión

Se determinó HbA1c utilizando el suero control Lyphochek Diabetes Control BIORAD (lote 240448) y se realizaron 20 determinaciones intradía. De los datos se obtuvo la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación para posteriormente aplicar el criterio de aceptabilidad.

Nota: De acuerdo con los criterios de aceptabilidad de BV Min bias para precisión intradía, la desviación estándar obtenida debe ser igual o menor a 1/4 del error total permitido, es decir, un criterio de 1.25%.

3. Evaluación de la veracidad

Para verificar la veracidad se utilizó la herramienta de material de referencia certificado.

- Valoración por el cálculo del error relativo

La veracidad del método analítico se estimó por medio del error relativo, para lo cual se utilizó el material de referencia BIORAD (lote 33970) considerado el valor asignado a éste como el valor verdadero (5.00% - 9.80%)

El cálculo del porcentaje de error relativo, se estimó mediante el cálculo de la media aritmética, desviación estándar y el coeficiente de variación de los resultados obtenidos intradía, aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de error relativo} = \left[\frac{(\text{Valor real} - \text{Valor de la medición})}{\text{Valor real}} \right] * 100$$

Nota: El criterio de aceptación debe ser que el valor sea menor o igual al reportado por BV min bias (2.50 %)

4. Correlación

Se procesaron muestras de suero en los analizadores Beckman Coulter AU 480 y CAPILLARYS II Flex Piercing durante 4 días consecutivos en abril de 2019. Posteriormente se seleccionaron 40 muestras que entraran dentro del rango de la concentración mínima y máxima permitida de HbA1c en el laboratorio central (4.0 a 14.7%).

Finalmente se realizó la distribución t de Student para dos muestras con el propósito de establecer la diferencia entre las varianzas y las medias de las muestras analizadas.

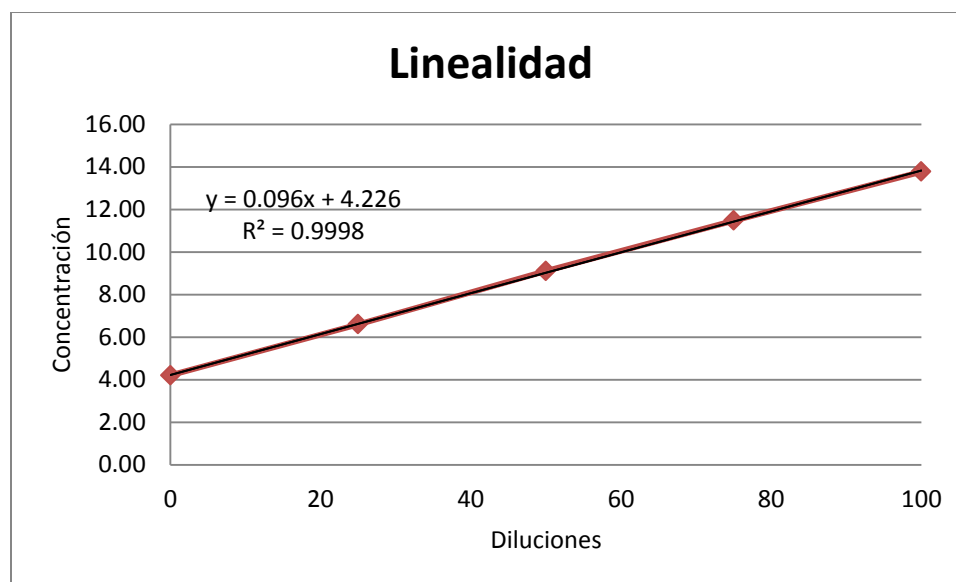
Nota: En una etapa de pretratamiento para el procesamiento de muestras de HbA1c en Beckman Coulter AU480, la sangre completa se mezcló con el reactivo hemolizante atemperado en una dilución 1:100 y se utilizó el hemolizado resultante.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

1. Linealidad

Tabla 5. Resultados de diluciones

Número de dilución	Dilución de la muestra	1	Resultados de la concentración 2	3	Media
1	0%	4.10	4.10	4.40	4.20
2	25%	6.60	6.60	6.60	6.60
3	50%	9.10	9.10	9.11	9.10
4	75%	11.50	11.50	11.40	11.47
5	100%	13.80	13.80	13.70	13.77



Gráfica 1. Linealidad de diluciones sobre el eje Y, en función de la concentración sobre el eje X.

La gráfica 1 muestra un coeficiente de correlación de 0.9998 por lo que indica que la gráfica es lineal ya que la proporción de la varianza de y puede atribuirse a la varianza de x debido a que el criterio para que el método sea lineal debe de ser igual o mayor a 0.99.

- Tabla 6. Resultados de la validación del intervalo reportable (intervalo validado)

	Valor inferior	Valor superior	Unidades	Tamaño del intervalo (Valor superior-valor inferior)	2/3 del intervalo del fabricante
Intervalo lineal reportado por el fabricante	4.00	14.70	%	(14.70-4.00) = 10.70	(10.7/3) *2 = 7.13
Intervalo verificado	4.20	13.77	%	(13.77-4.20) = 9.57	

El intervalo lineal reportado por el fabricante es de 4.00 y 14.70, mientras que el intervalo verificado de la media de los valores de concentración es de 4.20 y 13.77 (ver tabla 5).

El tamaño del intervalo verificado es de 9.57 por lo que el intervalo verificado es mayor a los 2/3 del intervalo del fabricante (7.53) aceptando así los resultados de la validación del intervalo reportable.

- Tabla 7. Resultados de la cuantificación de errores en el intervalo reportable

No. de dilución	Media de los valores de concentración	Valor teórico	Sesgo (desviación)	% error
1	4.20	$(4.20 \times 1) + (13.77 \times 0) = 4.20$	$4.20 - 4.20 = 0$	$[(0) / 4.20] \times 100 = 0$
2	6.60	$(4.20 \times 0.75) + (13.77 \times 0.25) = 6.59$	$6.60 - 6.59 = 0.01$	$[(0.01) / 6.59] \times 100 = 0.13$
3	9.10	$(4.20 \times 0.5) + (13.77 \times 0.5) = 8.98$	$9.10 - 8.98 = 0.12$	$[(0.12) / 8.98] \times 1000 = 1.34$
4	11.47	$(4.20 \times 0.25) + (13.77 \times 0.75) = 11.38$	$11.47 - 11.38 = 0.09$	$[(0.09) / 11.38] \times 100 = 0.81$
5	13.77	$(4.20 \times 0) + (13.77 \times 1) = 13.77$	$13.77 - 13.77 = 0$	$[(0) / 13.77] \times 100 = 0$

Como se observa en la tabla 7, la media del valor de concentración para la dilución 1 fue de 4.20, su valor teórico fue de 4.20, al restar la media y el valor teórico, se obtuvo un sesgo de 0.0 y un % de error de 0%.

La media del valor de concentración para la dilución 2 fue de 6.60, su valor teórico fue de 6.59, al restar la media y el valor teórico se obtuvo un sesgo de 0.01 y un % de error de 0.13%.

La media del valor de concentración para la dilución 3 fue de 9.10, su valor teórico fue de 8.98, al restar la media y el valor teórico se obtuvo un sesgo de 0.09 y un % de error de 1.34%.

La media del valor de concentración para la dilución 4 fue de 11.47, su valor teórico fue de 11.38, al restar la media y el valor teórico se obtuvo un sesgo de 0.09 y un % de error de 0.81%.

La media del valor de concentración para la dilución 5 fue de 13.77, su valor teórico fue de 13.77, al restar la media y el valor teórico se obtuvo un sesgo de 0.0 y un % de error de 0%.

El error total permitido de BV Min bias es de 2.50%, el % de error de todas las diluciones son menores a 2.50%, por lo tanto se toma la decisión de aceptar todas las pruebas.

2. Precisión

Tabla 8. Datos de HbA1c utilizando el suero control Lyphochek Diabetes Control BIORAD (lote 240448)

No. de lecturas	Fecha	Nivel 1 (%)	Nivel 2 (%)
1	24/02/2020	4.89	9.78
2	24/02/2020	4.93	9.76
3	24/02/2020	4.88	9.71
4	24/02/2020	4.89	9.61
5	24/02/2020	4.94	9.74
6	24/02/2020	4.93	9.68
7	24/02/2020	4.83	9.80
8	24/02/2020	4.93	9.76
9	24/02/2020	4.93	9.73
10	24/02/2020	4.91	9.73
11	24/02/2020	5.01	9.89

12	24/02/2020	4.91	9.81
13	24/02/2020	4.89	9.8
14	24/02/2020	4.93	9.84
15	24/02/2020	4.96	9.8
16	24/02/2020	4.89	9.8
17	24/02/2020	4.91	9.75
18	24/02/2020	4.93	9.76
19	24/02/2020	4.9	9.76
20	24/02/2020	4.94	9.79
Media		4.92	9.77
DE		0.04	0.06
CV		0.74	0.61

Como se observa en la tabla 8, el control 1 obtuvo una media de 4.92, una desviación estándar de 0.04 y un coeficiente de variación de 0.74%. Por otro lado, el control 2 presentó una media de 9.77, una desviación estándar de 0.06 y un coeficiente de variación de 0.61%.

De acuerdo con los criterios de aceptabilidad de BV Min bias para precisión intradía, la desviación estándar obtenida debe ser igual o menor a 1/4 del error total permitido, es decir, un criterio de 1.25%; ambos controles de Lyphochek Diabetes Control BIORAD presentaron un coeficiente de variación menor al error total permitido por lo tanto el método de cuantificación de HbA1c en CAPILLARYS II Flex Piercing es preciso.

3. Veracidad

Tabla 9. Media, desviación estándar y coeficiente de variación del material de referencia BIORAD (lote 33970)

	Nivel 1	Nivel 2
Media	4.93	9.77
DE	0.03	0.06
CV	0.70	0.61

Nivel 1:

$$\% \text{ error relativo} = \left(\frac{4.93 - 5.00}{5} \right) * 100 = -1.50\%$$

Nivel 2:

$$\% \text{ error relativo} = \left(\frac{9.77-9.80}{9.80} \right) * 100 = -0.36\%$$

Como se observa en la tabla 9, el control 1 obtuvo una media de 4.93, una desviación estándar de 0.03 y un coeficiente de variación de 0.70%. Mientras que el nivel 2 obtuvo una media de 9.77, una desviación estándar de 0.06 y un coeficiente de variación de 0.61%.

Para calcular el porcentaje de error relativo se restó la media obtenida del nivel 1 y 2 (4.93 y 5.00% respectivamente) con el valor verdadero del material de referencia (9.77 y 9.80%), se dividió entre el valor verdadero de cada nivel y se multiplicó por 100. Obteniendo así un % de error relativo de -1.50% para el nivel 1 y -0.36% para el nivel 2.

Los porcentajes de error relativo de los niveles 1 y 2 (-1.50% y -0.36% respectivamente) de Lyphochek Diabetes Control BIORAD son menores al reportado por BV Min bias (2.50%), por lo tanto la veracidad del método es aceptable debido a que entre menor sea el porcentaje de error relativo mayor será la veracidad del método.

4. Correlación

Tabla 10. Datos de HbA1c obtenidos de los analizadores CAPILLARYS II Flex Piercing y Beckman Coulter AU 480 en abril de 2019.

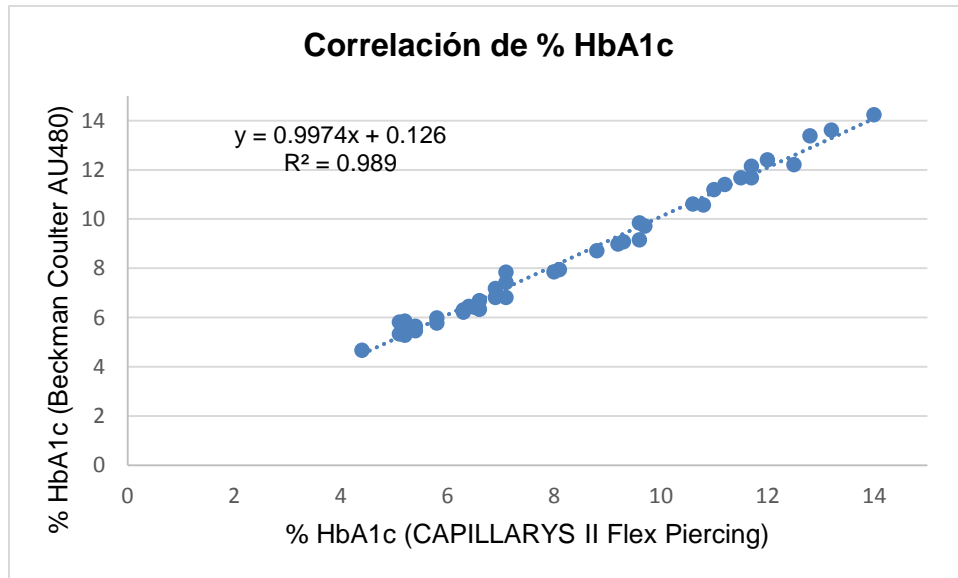
	ID	CAPILLARYS II Flex Piercing	Beckman Coulter AU 480
1	4008042144	4.2	4.13
2	4009042100	4.9	4.92
3	4007041026	5.3	5.46
4	4008042090	5.3	5.29
5	4008042113	5.6	5.5
6	4009041045	5.6	5.82
7	4009042070	5.5	5.64
8	4009042093	5.5	5.55
9	4010042188	6.7	6.6
10	4007041008	7.0	6.66
11	4008042187	7.1	6.86
12	4009042008	7.8	7.64
13	4007041028	7.9	7.64
14	4008042185	7.9	7.66
15	4007041013	7.7	7.38
16	4009042091	7.7	7.56
17	4007041029	7.8	7.5
18	4009042008	7.8	7.64

19	4007041028	7.9	7.64
20	4007041027	8.3	8.09
21	4008042182	8.9	8.77
22	4008042104	9.3	8.94
23	4011042018	10.0	10.29
24	4009042074	10.2	9.54
25	4009042085	10.4	10.18
26	4009042030	10.6	10.7
27	4011042047	10.8	10.92
28	4008042018	11.1	10.6
29	4010042075	11.1	11.37
30	4009042066	11.2	11.45
31	4008042013	11.3	11.3
32	4010042057	11.3	4.53
33	4009042095	11.6	10.85
34	4009042084	11.8	11.41
35	4008042034	12	12.17
36	4011042087	12	12.54
37	4009042068	12.2	12.95
38	4008041001	13.2	13.04
39	4011042035	13.3	13.67
40	4009041018	13.6	13.68

Tabla 11. Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales

	CAPILLARYS II Flex Piercing	Beckman Coulter AU 480
Media	8.4125	8.517
Varianza	7.4052	7.4496
Observaciones	40	40
Grados de libertad	78	
Estadístico t*	-0.1715*	
P(T<=t) dos colas	0.8643	
Valor crítico de t (dos colas)*	1.9908*	

En la tabla 11 se observa que la media de HbA1c por el método electroforesis capilar del analizador CAPILLARYS II Flex Piercing fue de 8.41% y por el método inmunoinhibición turbidimétrica de Beckman Coulter AU 480 fue de 8.517%. Al aplicar la prueba de t de Student no se encontró diferencia significativa en los valores de hemoglobina glicada en las muestras analizadas ya que el valor crítico de t de dos colas es mayor al estadístico t.



Gráfica 2. Correlación de % HbA1c en los analizadores CAPILLARYS II Flex Piercing y Beckman Coulter AU480.

En el gráfico número 2 se observa que existe un coeficiente de correlación de 0.989 entre el % de HbA1c determinada por el método de electroforesis capilar (CAPILLARYS II Flex Piercing) y por el método inmunoinhibición turbidimétrica (Beckman Coulter AU 480). Esto permite decir que ambos métodos tienen una alta correlación de los datos dentro del rango correspondiente a cada uno.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo, el analizador CAPILLARYS II Flex Piercing resultó ser un método lineal para la HbA1c obteniendo un coeficiente de correlación mayor de 0.99%; en el estudio de la linealidad de la técnica CAPILLARYS HbA1c realizado siguiendo las recomendaciones EP6-A "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A statistical Approach" del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI-USA); menciona que el análisis de una mezcla en proporciones variables de dos muestras de sangre diferentes (una muestra normal con 4,0 % de HbA1c, y una muestra patológica con 14,7 % de HbA1c) muestra que el porcentaje de la fracción HbA1c está perfectamente correlacionado con la proporción de las 2 sangres en la mezcla, y que cualquier variación es detectada de forma lineal con la técnica CAPILLARYS Hb A1c. (Sebia, 2012)

Por otra parte, de acuerdo con los criterios de aceptabilidad de BV Min Bias para precisión intradía, la desviación estándar obtenida debe ser igual o menor a $\frac{1}{4}$ del error total permitido, es decir, un criterio de 1.25%. Paloma Oliver y Fernando Gómez en 2019, mencionaron las especificaciones de calidad deseables para la HbA1c en sangre según la base de datos de variación biológica de la SEQC (Paloma, et. al, 2019) con un coeficiente de variación de 0.93%, un error sistemático de 1.50% y un error total de 3.02%; en este estudio se obtuvo un coeficiente de variación de 0.74% y 0.61% para los controles de Lyphochek Diabetes Control BIORAD 1 y 2 respectivamente, por lo que en ambos casos el método de cuantificación de HbA1c en CAPILLARYS II Flex Piercing es preciso. Los laboratorios deben ser conscientes de las interferencias y limitaciones del método de ensayo, es muy importante que los resultados sean confiables y libres de interferencias. También es esencial para la economía del laboratorio, que el método sea preciso.

La electroforesis capilar es una herramienta analítica que ha reemplazado muchos métodos de laboratorio clínico convencionales, especialmente la electroforesis y la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). La atracción principal de la electroforesis capilar es que es un método simple, rápido, económico, reproducible, utiliza pequeñas cantidades de muestra y reactivos y es extremadamente versátil, capaz de separar variantes comunes de Hb. (Petersen, et. al, 2003). También ofrece la ventaja de un patrón claro sin separación de la fracción glicosilada de Hb, medición precisa de las fracciones de Hb (como HbA2) y alta resolución con un alto rendimiento. Desarrollado en la última década, el CAPILLARYS II Flex Piercing tiene un rendimiento superior en comparación con otros sistemas, proporcionando un patrón fácil de interpretación, y no tiene la necesidad de tener en cuenta los productos glicosilados y de descomposición al medir las variantes de Hb más comunes. (Riou, et, al. 2018).

Los métodos inmunológicos de determinación de la HbA1c basados en la reacción antígeno-anticuerpo han experimentado un importante desarrollo en los últimos años y presentan la gran ventaja de ser procesos completamente automatizables. Asegura una

alta especificidad en la detección de la HbA1c, además, esta característica hace que el ensayo no se vea afectado por la presencia de la gran mayoría de variantes estructurales de la hemoglobina, ya que hay muy pocas que presentan cambios de aminoácidos en la posición terminal y las que los presentan son poco comunes. Por lo tanto, en muestras de pacientes con variantes estructurales de hemoglobina en la cadena beta, se esperaría que los resultados de HbA1c obtenidos por este método analítico fueran diferentes ya que es capaz de detectar también las formas N-glicadas en la valina terminal de la mayoría de variantes. (Bry, et. al, 2001)

Sin embargo, el método de inmunoinhibición turbidimetría (Beckman Coulter AU480) presenta una desventaja importante en comparación con la electroforesis capilar del analizador CAPILLARYS II Flex Piercing y es que este necesita un pretratamiento antes del procesamiento de las muestras de HbA1c, siendo así más costoso y tardado en comparación con el método de electroforesis capilar de CAPILLARYS II Flex Piercing.

La importancia de los niveles de HbA1c en el tratamiento de la diabetes mellitus requiere métodos eficientes y confiables para la medición de la hemoglobina glicada. En este estudio no se encontraron diferencias significativas entre los métodos de electroforesis capilar e inmunoinhibición turbidimétrica respecto a los valores de HbA1c en un rango de 4.0%-14.70%. Se presenta una buena concordancia entre los resultados de HbA1c en los analizadores CAPILLARYS II Flex Piercing y Beckman Coulter AU480.

Un artículo de Bhat et. al, en 2012 sugiere que 0.5% de HbA1c es un cambio clínicamente significativo, por lo tanto, es importante asegurarse de que un cambio de esta magnitud es estadísticamente significativo y no una variación analítica (Chang, 1998) (Robertson, 2008). Los resultados obtenidos en este estudio comparando dos metodologías diferentes en diferentes analizadores no presentan una variación mayor al 0.5% por lo que no presentan diferencias significativas.

CONCLUSIÓN

Se puede concluir que el método de electroforesis capilar para HbA1c en el analizador CAPILLARYS II Flex Piercing cumple con los requisitos especificados de linealidad, precisión y veracidad con base en la Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico emitido por la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA).

Al tomar medidas estrictas de control de calidad de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio, la HbA1c también se puede medir mediante el método inmunoinhibición turbidimetría en el analizador Beckman Coulter AU 480, sin embargo, por cuestiones de costo y tiempo, CAPILLARYS II Flex Piercing es una mejor alternativa.

BIBLIOGRAFÍA

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes care, 37(Supplement 1), S81-S90. 2014.

Amor, S. El laboratorio clínico y el control de calidad. Bioquímica, 31(2), 39-40. 2006.

Annardx, Ensayo LIAISON. EUA. 2012 de: <http://www.annardx.com/index.php/diasorin>

Bhatt, J., Thomas, S., Nanjan, J. Resveratrol supplementation improves glycemic control in type 2 diabetes mellitus. Nutrition research, 32(7), 537-541. 2012

Briozzo, G. Perego, M. Moirón, M. Comparación de dos métodos para la determinación de Fosfatasa Alcalina en suero. Revista del Hospital Materno Infantil Ramón Sardá, 26(4), 148-153. Argentina 2007.

Bry L, Chen PC, Sacks DB. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. Clin Chem. 47:153-63. 2001

Burtis E, Bruns D. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 4th edition. St. Louis, Missouri. Elsevier-Saunders. Cap.14. p. 353-407. 2006.

Beckman Coulter. Instructions for use: AU HbA1c(Hemoglobin A1c). Estados Unidos. 2019.

Bunn, H. Haney, N. Kamin, S. Gabbay, K. Gallop, P. The biosynthesis of human hemoglobin A1c. Slowglycosylation of hemoglobin in vivo. J Clin Invest. 57: 1652-1659. 1976.

Campuzano, G. Latorre, G. La HbA1c en el diagnóstico y en el manejo de la diabetes. Medicina & Laboratorio, 16(05-06), 211-241. 2010.

Cardona, Z. Calificación de instalación, operación de equipos de la industria farmacéutica. Caracas, Venezuela. 2013.

CENAM. Guía sobre la calificación de equipo de instrumentos analíticos. México. 2012.

Chang, J. Evaluation and interference study of hemoglobin A1c measured by turbidimetric inhibition immunoassay. 109(3):274-8. 1998.

EMA. Acreditación y sus beneficios de: https://www.ema.org.mx/portal_v3/index.php/proceso-de-acreditacion/la-acreditacion-y-sus-beneficios

ema, CENAM. Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico. México. 2008.

ENAC. La Acreditación de laboratorios clínicos. Madrid. 2018.

Federación Internacional de Diabetes (IDF). Diabetes atlas. 7ta edición. 2015.

Guglielmo, Elías R, Kiener R, Collino C, Barzón S. Verificación de métodos en un laboratorio acreditado y planificación del control de calidad interno. Córdoba Argentina. Acta bioquímica clínica latinoamericana. 45. 335-347.2011.

Gugliucci A. Glicación de proteínas: rol protagónico de la hiperglicemia en las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. RevMed Uruguay. 16:58-75. 2000.

Instituto de Salud Pública de Chile. Guía de Inspección de Buenas Prácticas de Manufactura (GPM) para la Industria de Productos Farmacéuticos. Chile. 2010.

Jeppsson J, Kobold U, Barr J, Finke A, Hoelzel W, Hoshino T. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood. ClinChemLabMed. 40: 78-89. 2002.

Khazam, J. Aplicación de la Calificación a la Ingeniería. Caracas, Grupo Vargas. 2015.

Krouwer J. Setting performance goals and evaluating total analytical error for diagnostic assays. ClinChem. 6 (48): 919–27. 2002.

La Norma Internacional ISO 15189:2012 (NMX-EC-15189-IMNC-2015) de: http://www.metrycal.com/Main/La_Norma_Internacional_ISO_15189.pdf

LIAISON XL. (07 septiembre 2019) de: <http://www.diasorin.com/en/immunodiagnostic-solutions/systems/clia-systems/liaisonr-xl>

Messeguer, J. Gómez, J. Verde, M. Marca, C. Gascón, F. García, S. Aceña, M. Manual Práctico de Análisis Clínicos en Veterinaria. España. MIRA. 445 p.1992.

Moyano, D. Calificación del disolutor ATG dissolution systems de qualipharm laboratorio farmacéutico y validación del método de disolución. Ecuador, 2012.

NMX-CH-152-IMNC-2005. Metrología en química-vocabulario.

OMS (30 octubre 2018) de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>

Paloma, O. Peralta, F. Glucosa y HbA1c en el laboratorio y como point of care testing en diferentes entornos clínicos. España, 2019.

Petersen, R. Okorodudu, O. Mohammad, A. Payne, A. Capillary electrophoresis and its application in the clinical laboratory. Clinica Chimica. Acta, 330(1-2), 1-30. 2003

Peterson, K. Pavlovich, J. Goldstein. D, Little, R. England, J. Peterson CM. What is hemoglobin A1c. An analysis of glycated hemoglobins by electrospray ionization mass spectrometry. Clin Chem. 44: 1951-1958. 1998.

Política de selección y validación de métodos de ensayo, Oficina de Acreditación Guatemala, 2005.

Riou, J., Szuberski, J., Godart, C., Wajcman, H., Oliveira, L., Hoyer, D., Bardakdjian-Michau, J. Precision of CAPILLARYS 2 for the detection of hemoglobin variants based on their migration positions. American journal of clinical pathology, 149(2), 172-180. 2018.

Robertson, P. Fuel excess and dysfunction Endocrine Reviews. 29:351-366. 2008.

Roso, M. Calificación de instalación, operación y desempeño de equipos de análisis y fabricación de productos farmacéuticos. Sartenejas. 2015.

SEBIA. CAPILLARYS HbA1c. 2012.

Westgard J. A method evaluation decision chart (MEDx chart) for judging method performance. Clin Lab Sci. 8: 277-83. 1995.

Williams N. How reliable is laboratory testing? ____ de: <http://labtestsonline.org/understanding/features/reliability/hmt>. February2005.



M.A.O.S. Claudia Tavera Alonso

Cédula profesional: 1317039

Asesor externo



Felipe Mendoza Pérez

Número económico: 07183

Asesor interno