

González, Fernando Ariel

# Verificación de especificaciones analíticas para la determinación de la Hormona Paratiroidea Intacta (PTH)

2022

*Instituto: Ciencias de la Salud*

*Carrera: Bioquímica*



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons.  
Atribución – no comercial – sin obra derivada 4.0  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Documento descargado de RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital de la Universidad Nacional Arturo Jauretche

Cita recomendada:

González, F. A. (2022). *Verificación de especificaciones analíticas para la determinación de la Hormona Paratiroidea Intacta (PTH)* [tesis de grado, Universidad Nacional Arturo Jauretche]

Disponible en RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital UNAJ <https://biblioteca.unaj.edu.ar/rid-unaj-repositorio-institucional-digital-unaj>



Instituto de Ciencias de la Salud

Carrera: Bioquímica

**Verificación de especificaciones analíticas para la determinación de la  
Hormona Paratiroidea Intacta (PTH)**

Alumno: Fernando Ariel González

Directora: Marina Laguarde

Co-Directora: Andrea Villagra

## Resumen

**Introducción:** La parathormona (PTH) es una hormona peptídica secretada por la glándula paratiroides, tiene como función principal regular la concentración plasmática de calcio y fósforo. Los trastornos de la glándula paratiroides conducen principalmente a niveles de calcio disminuidos o elevados según la secreción de PTH. La hipofunción de la glándula causa hipoparatiroidismo, la hiperfunción causa hiperparatiroidismo (HPT), este se puede clasificar en HPT primario (adenomas de la glándula paratiroidea), HPT secundario (causado por otros estados patológicos, ej: enfermedad renal crónica) y HPT terciario ( la glándula se autonomiza aun después de haber corregido la causa principal). Por este motivo se requiere de una prueba altamente sensible, precisa y exacta en un amplio rango de medición para obtener resultados seguros y clínicamente útiles. **Objetivos:** Realizar la verificación de las especificaciones analíticas declaradas por el fabricante en términos de precisión, exactitud, veracidad, linealidad e intervalo de referencia para la determinación en suero de la PTH siguiendo los lineamientos de los protocolos proporcionados por la CLSI (Instituto de estándares para el laboratorio clínico). **Materiales y métodos:** Se utilizaron las Guías EP 15 A3 (precisión y estimación del sesgo), EP 6A (linealidad), EP 28 A3 (verificación del intervalo de referencia), planillas de cálculo, programa informático LinCkecker, autoanizador de electroquimioluminiscencia Cobas e411, mensurando y materiales descartables. **Método del ensayo:** Inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (técnica de sándwich). **Conclusiones:** Se verifico que las especificaciones analíticas declaradas por el fabricante para la determinación de PTH, de precisión y veracidad cumple satisfactoriamente en las condiciones de trabajo del Laboratorio del Hospital el Cruce. Además se pudo verificar la linealidad clínica en un amplio rango de medición, y se comprobó que el intervalo de referencia propuesto por el fabricante puede ser utilizado para la población que acude a este Laboratorio.

**Palabras claves:** Verificación de las especificaciones analíticas, Parathormona, hipoparatiroidismo, hiperparatiroidismo, precisión, veracidad, intervalo de referencia, electroquimioluminiscencia, EP 15 A3, EP 6A, EP 28 A3.

# Índice

## 1-Introducción

## 2-Importancia del tema

## 3-Objetivos

- Objetivo general
- Objetivo específico

## 4-Desarrollo

- ¿Qué es la CLSI?
- EP 15 A3 Precisión y estimación del sesgo
- EP 6 A Linealidad
- EP 28 A3 Verificación de intervalos de referencia

## 5-Materiales y métodos

- Principio del test
- Técnica Sandwich

## 6-Resultados

## 7-Conclusiones

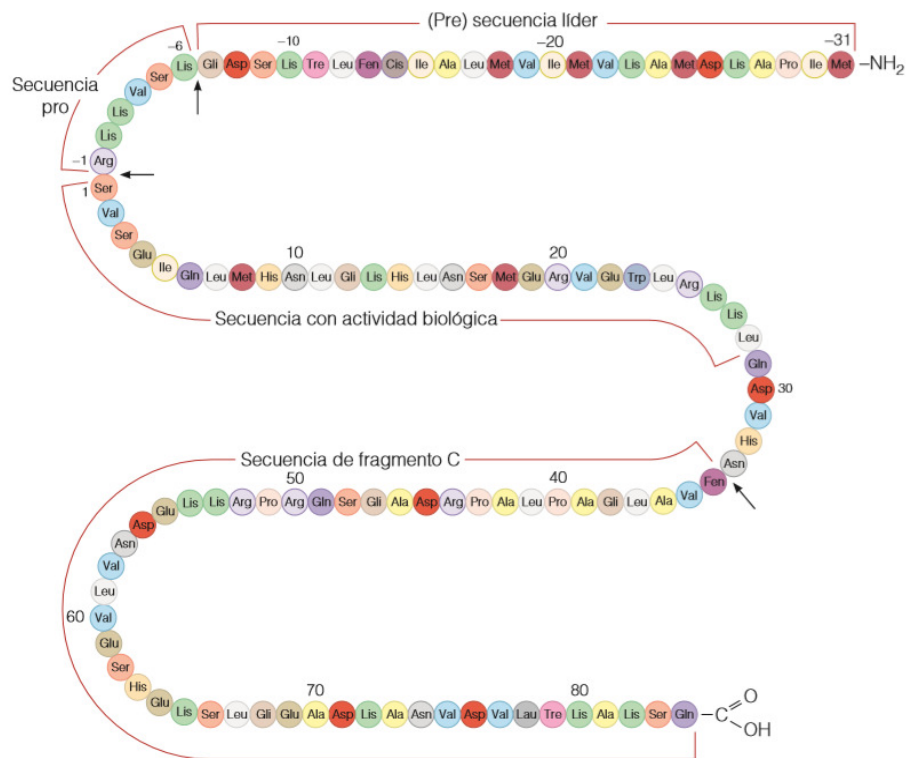
## 8-Referencias Bibliográficas

## 9-Glosario

## Introducción

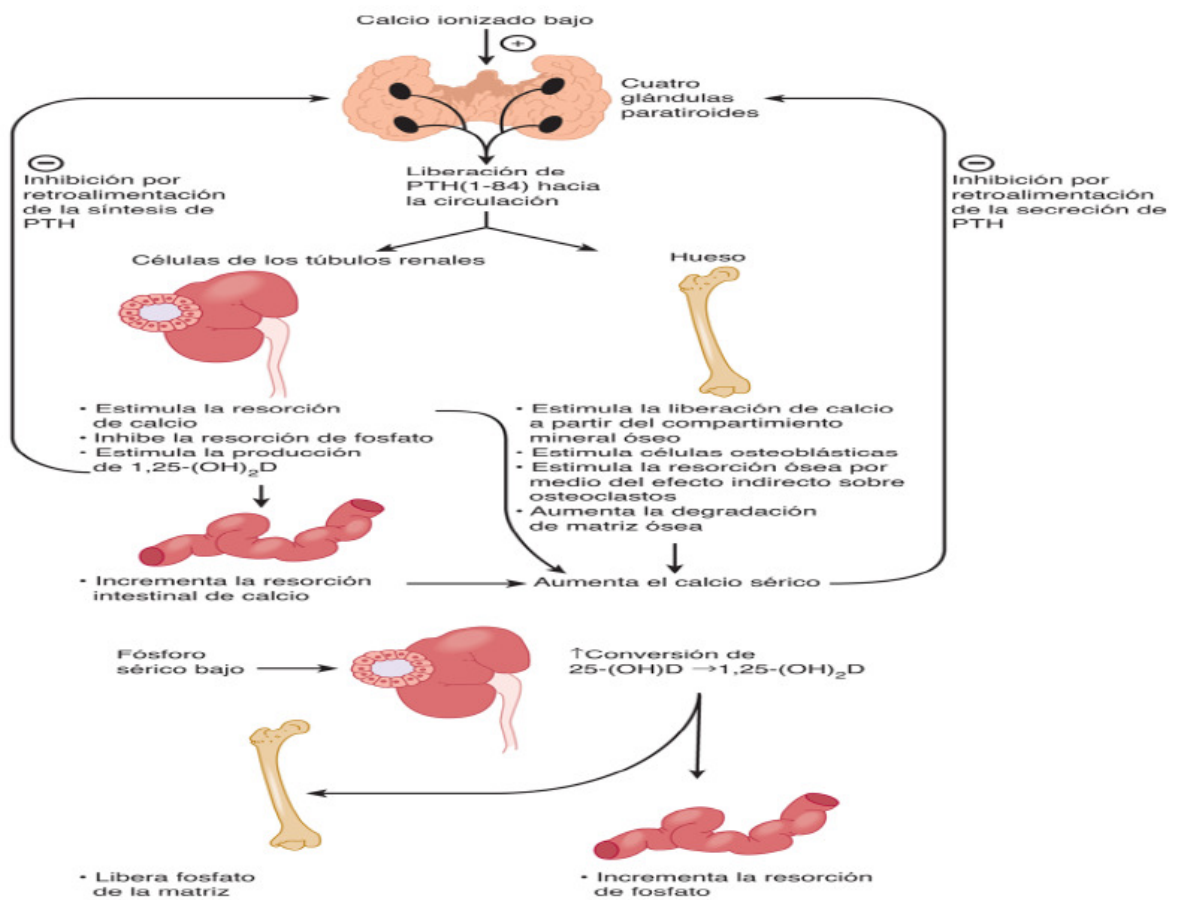
La PTH es un importante biomarcador del funcionamiento de las glándulas paratiroides, además es utilizado como control de una variedad de anomalías del esqueleto y del metabolismo mineral que ocurre como complicación de la insuficiencia renal crónica y en el hiperparatiroidismo terciario como enfermedad ósea metabólica después de un trasplante renal exitoso.

La parathormona (PTH) es un péptido monocatenario de 84 aminoácidos (FIGURA 1) secretado por las glándulas paratiroides en respuesta a concentraciones disminuidas extracelulares de calcio iónico <sup>1</sup>.



**Figura 1:** Estructura primaria de la hormona preparatiroides humana . Las flechas indican sitios de divisiones específicas que ocurren en la secuencia de biosíntesis y metabolismo periférico de la hormona. La secuencia que tiene actividad biológica está encerrada en el medio de la molécula <sup>2</sup>.

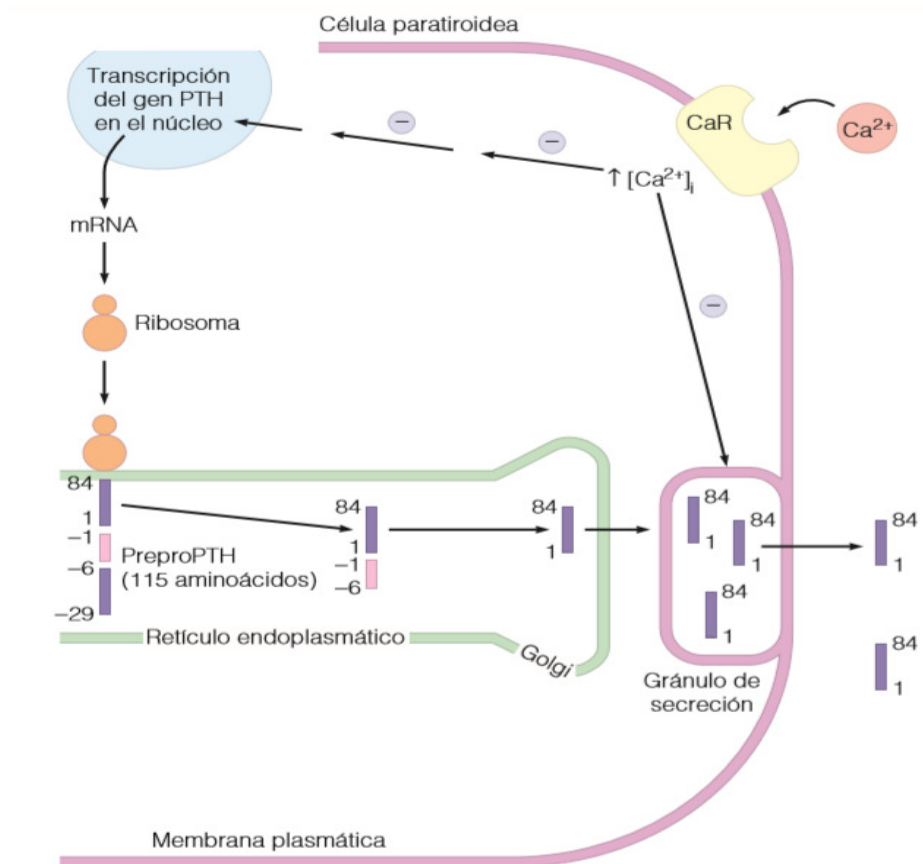
Tiene como función principal incrementar las concentraciones séricas de calcio estimulando la movilización del calcio desde el hueso y su reabsorción renal en el túbulo distal. En el túbulo proximal, la PTH estimula la síntesis de vitamina D que a su vez aumenta la absorción intestinal de calcio y ejerce una retroalimentación endocrina sobre la secreción de PTH en el nivel de las paratiroides. La PTH también disminuye la reabsorción renal de fosfato en el túbulo proximal, lo que disminuye el fosfato sérico <sup>1</sup>.



**Figura 2:** Funciones de la PTH<sup>3</sup>.

La secreción de la PTH es regulada por la concentración del calcio en el líquido extracelular a través de sensores de calcio que se encuentran en la membrana de las células principales de las glándulas paratiroides, estas contienen al receptor sensible al calcio (CaSR) el cual monitorea la concentración de calcio en el líquido extracelular (LEC). Un descenso en la

concentración de calcio aumenta la expresión del gen que codifica la PTH y su liberación por las células principales. Al contrario, un aumento en la concentración de calcio disminuye la liberación de PTH por estas células <sup>4</sup>.



**Figura 3:** Síntesis de PTH dentro de la célula paratiroidea<sup>2</sup>.

El metabolismo de la PTH es complejo y produce diversos fragmentos con distinta actividad biológica e inmunológica. La PTH intacta es la forma biológicamente activa y tiene una vida media en la circulación menor a cuatro minutos, es rápidamente aclarada por el riñón y el hígado <sup>5</sup>.

## **Importancia del tema**

Los trastornos de la glándula paratiroides conducen a niveles elevados o reducidos de calcio en sangre (hipercalcemia o hipocalcemia) provocada por un cambio en la secreción de PTH. Para detectar una disminución funcional de la glándula (hipoparatiroidismo) se requiere el uso de una prueba altamente sensible para poder medir niveles de PTH muy por debajo de lo normal. La hiperfunción de las glándulas paratiroides produce un aumento de la secreción de PTH causado en primer lugar por los adenomas de las glándulas paratiroides (hiperparatiroidismo primario). En el hiperparatiroidismo secundario (HPT2°) el nivel de calcio en sangre es bajo como resultado de otros estados patológicos (por ejemplo, deficiencia de vitamina D, hiperfosfatemia, enfermedad renal crónica, síndrome de malabsorción, etc). El hiperparatiroidismo terciario ocurre cuando la hiperplasia adaptativa multiglandular de las paratiroides (hiperparatiroidismo secundario) se autonomiza aun después de haber corregido la causa que lo provoca. Luego del trasplante renal exitoso en el HPT2°, se normaliza la excreción de fosfato, la hidroxilación renal de vitamina D, con lo que disminuye la PTH y la resorción ósea, se normaliza la calcemia y se reduce la hiperplasia de células paratiroides, mejorando el cuadro clínico en 6 a 18 meses. Pero en el 2 al 40% de los enfermos, luego del trasplante persiste la elevación de PTH y el síndrome bioquímico de hiperparatiroidismo <sup>6</sup>.

La determinación de la PTH intraoperatoria durante la resección del adenoma ubicado en las glándulas paratiroides se efectúa en casos de hiperparatiroidismo primario, así como también en el hiperparatiroidismo secundario relacionado con insuficiencia renal, y en el hiperparatiroidismo terciario. Debido a que la PTH tiene una vida media de 3 a 5 minutos, una caída significativa en los niveles de PTH después la resección de la glándula o glándulas anormales permite al cirujano evaluar el éxito de la cirugía, y así dar por finalizada la intervención <sup>6,7</sup>.

El presente trabajo se realizó en el Sector de Endocrinología del Laboratorio del Hospital El Cruce, Alta Complejidad en red, Dr. Néstor C. Kirchner, S.A.M.I.C.

El Hospital El Cruce es una institución de alta complejidad, que funciona en red con otras instituciones sanitarias de la subregión sudeste de la RSVI.

La determinación de PTH es solicitada mayoritariamente por los servicios de Endocrinología, Trasplante Renal y Cirugía, los cuales la solicitan para el seguimiento de los trastornos de la



glándula paratiroidea, HPT1°, HPT2° y durante cirugías, para saber si todo el tejido hiperfuncionante fue removido.

Verificar una metodología desde el punto de vista analítico, sumado a planificar un control interno y externo de la calidad, nos permite entregar resultados confiables, seguros y clínicamente útiles para la determinación en suero de PTH intacta.

### **Objetivo general:**

Realizar la verificación de especificaciones analíticas declaradas por el fabricante para la determinación cuantitativa de PTH en suero por medio de la técnica de inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) previsto para el uso en autoanalizador Cobas e411.

### **Objetivo específico**

Verificar las especificaciones analíticas del fabricante siguiendo las guías CLSI:

-EP 15 A3 -Precisión y estimación de sesgo. El protocolo de verificación EP 15 A3 es la guía CLSI para comprobar que un test (procedimiento de medida), cumple con las expectativas del laboratorio, en los aspectos básicos de precisión y veracidad.

-EP 6-A Linealidad. El protocolo de verificación EP 6-A es la guía CLSI que presenta un método para establecer, verificar y demostrar el rango lineal de un procedimiento de medición cuantitativo.

-EP 28 A3-Intervalo de referencia. El protocolo de verificación EP 28 A3 contiene pautas para determinar los valores de referencia y los intervalos de referencia para las pruebas cuantitativas de laboratorio clínico.

## **Desarrollo**

### **¿Qué es la CLSI?**

La CLSI (Instituto de estándares para el laboratorio clínico) es una organización sin fines de lucro, inicialmente impulsada por el gobierno de EE.UU, cuyo fin es la elaboración de estándares de elevada calidad para mejorar las prácticas del laboratorio de análisis clínicos.

Inicialmente su nombre era NCCLS (comité nacional de estándares de laboratorio) nacida a finales de los 70 cuyo propósito era la creación de documentos que mejoraran la práctica de laboratorio clínico estandarizando la realización de los ensayos.

Los documentos en cuestión son preparados en consenso entre las partes involucradas: usuarios, fabricantes, institutos y entes reguladores. Los mismos requieren de discusiones y mucho tiempo para su elaboración.

Por ser los estándares producidos de un alto nivel, empezaron a ser empleados en otras latitudes, lo que llevó a la NCCLS a ocupar el rol de principal generador de estándares de consenso para el laboratorio clínico, y probablemente conllevó a su cambio de nombre al de CLSI en 2005.

La nomenclatura de los estándares es muy sencilla, por ejemplo el EP28-A3 constituye el identificador único, usualmente conformada por un código de una o de dos letras (asociada a un área de conocimiento) y un número, mientras que en A-3, la letra A indica que es la versión aprobada y la cifra que le sigue, su número de edición <sup>8</sup>.

### **EP 15 A3 -Precisión y estimación de sesgo**

Describe métodos para la demostración de precisión y veracidad de los métodos cuantitativos desarrollados en el laboratorio. Las características específicas que aparecen en este documento son repetibilidad, precisión intralaboratorio y veracidad relativos a un estándar aceptado (según las estimaciones de la medida del sesgo).

Al completar los protocolos recomendados en esta guía, el laboratorio habrá comprobado que el método funciona de acuerdo con los señalamientos del fabricante para la precisión y veracidad <sup>9</sup>.

Los indicadores estadísticos utilizados son el desvío estándar (DS), el coeficiente de variación (CV) y el sesgo o BIAS.

### Estadísticos para evaluación

DS: Es una medida que ofrece información sobre la dispersión media de una variable<sup>10,11</sup>.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_1^N (x_i - \bar{X})^2}{N}}$$

•  $X$  → Variable

•  $x_i$  → Observación número  $i$  de la variable  $X$ .

•  $N$  → Número de observaciones.

•  $\bar{X}$  → Es la media de la variable  $X$ .

**CV:** El coeficiente de variación, también denominado como coeficiente de variación de Pearson, es una medida estadística que nos informa acerca de la dispersión relativa de un conjunto de datos<sup>11,12</sup>.

$$CV\% = DS / X * 100$$

**Precisión:** Acuerdo entre los valores obtenidos en mediciones de repetibilidad bajo condiciones específicas. Es una estimación del error aleatorio (EA).

$$EA = 2CV\%_{IC\ 95\%}$$

**Sesgo (de medida):** Estimación del error sistemático (ES) de una medición. Es la proximidad entre la media de un número de valores medidos repetidos y un valor de referencia o valor verdadero (VV).

$$ES\% = (X - VV) / VV * 100$$

$$ET = ES + EA$$

**Error Total aceptable:** Los objetivos del error total se deben establecer como la diferencia máxima permitida entre el resultado de una muestra individual y el valor objetivo de esa muestra. Se puede determinar el valor objetivo a través de:

- El grupo de pares del método en las pruebas de aptitud;
- Un método de referencia asignado en pruebas de aptitud;
- Un método comparativo en una comparación experimental de muestra de pacientes.
- El fabricante de un material de referencia.

**Requisito de la calidad (ET admitido):** Especificaciones acerca de la tasa de error que puede ser permitida para un procedimiento de medida sin invalidar la utilidad clínica de resultados generados por el mismo <sup>11</sup>.

Para este trabajo se eligió como requisito de calidad la variabilidad biológica deseable para PTH en suero obtenida de tablas en la página de Westgard QC <sup>13</sup> cuyo valor es de 30%.

### **Desarrollo del protocolo** <sup>14,15</sup>

Para realizar el protocolo necesitamos 2 o 3 materiales de control, idealmente con concentraciones próximas a los niveles de decisión médica,( estos materiales tienen distintos niveles de jerarquía) , planillas de cálculo o software, inserto del reactivo e información sobre la estimación del valor verdadero del material empleado.

#### **Escala de jerarquía para los materiales:**

- Materiales certificados de referencia.
- Materiales de referencia.
- Controles de veracidad.
- Materiales de control con participación en esquemas interlaboratorios.
- Materiales que hayan participado en una encuesta de un programa de evaluación externa de la calidad.
- Materiales de control comerciales con valores asignados.

Para este trabajo se utilizó el control de calidad con valor asignado provisto por el fabricante.

**Verificación de la precisión:** Tiene como objetivo comparar el CV obtenido con el CV declarado por el fabricante, para verificar que ambos desempeños son semejantes.

<b>Condiciones de repetibilidad ( CVr)</b>	<b>Condiciones intralaboratorio, total o intermedia (CVwl)</b>
El mismo procedimiento de medida	El mismo procedimiento de medida
El mismo laboratorio	El mismo laboratorio
El mismo equipo	El mismo equipo
El mismo operador	El mismo operador o no
El mismo reactivo (Lote/envase) y la misma calibración	-
Repeticiones en un intervalo <b>corto</b> de tiempo	Repeticiones en un intervalo <b>prolongado</b> de tiempo

Criterio de evaluación de datos aberrantes: Para el tratamiento de los valores discordantes, tener en cuenta:

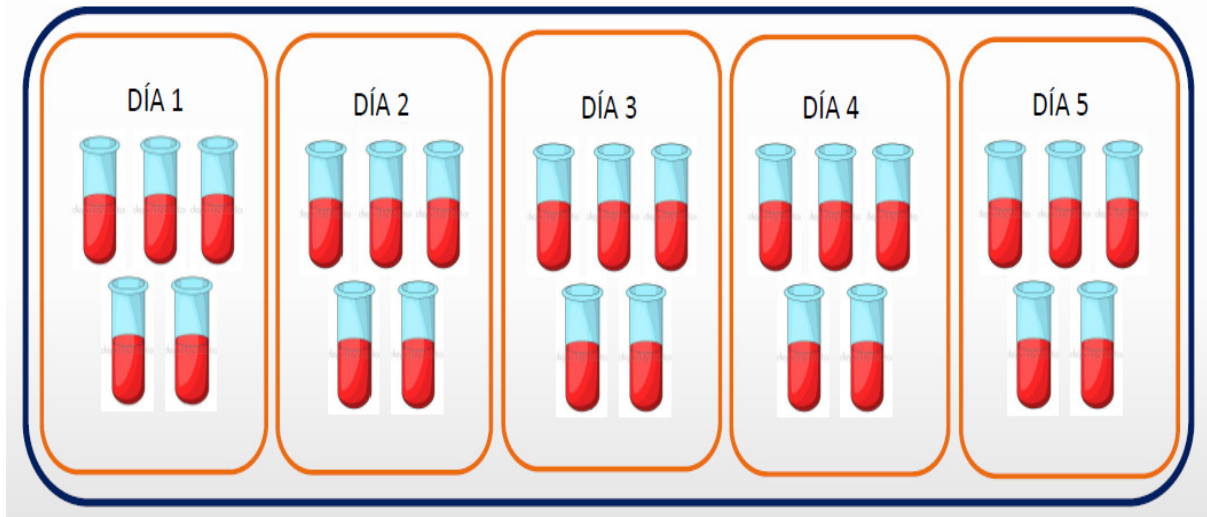
Límite de Grubss:  $X \pm 3,135 * DS$

-Como máximo un resultado por nivel puede ser tratado estadísticamente como discordante.

-Como máximo dos datos pueden ser considerados discordantes desde el punto de vista estadístico en todo el protocolo.

**Esquema a aplicar a cada nivel de decisión médica evaluado:**

Se analiza una corrida por día con 5 réplicas para cada una de las dos concentraciones diariamente por cinco días.



**Figura 4:** Esquema para cada nivel aplicable durante 5 días.

A partir de estos datos se calculan el Desvío Estándar y el Coeficiente de variación en Condiciones de Repetibilidad (CV<sub>r</sub>) y el Desvío Estándar y el Coeficiente de variación en Condiciones Intralaboratorio (CV<sub>wl</sub>).

Entonces si el Coeficiente de variación en condiciones de repetibilidad ( CV<sub>r</sub>) obtenido es menor o igual al Coeficiente de variación en condiciones de repetibilidad declarado por el fabricante se dice que la verificación es aceptada.

**CV<sub>r</sub> (obtenido) < CV<sub>r</sub> (fabricante) = Verificación de precisión en condiciones de repetibilidad aceptada.**

Verificación extendida: Si el CV<sub>r</sub> obtenido es mayor al del fabricante se compara con el límite superior de verificación para el CV<sub>r</sub> estimado a partir de la especificación del fabricante tomada del inserto (UVR CV<sub>r</sub>).

**CVr (obtenido) < UVR CVr = Verificación de precisión en condiciones de repetibilidad aceptada**

Para el caso de la verificación de la precisión en condiciones intralaboratorio, total o intermedia (CVwl) se procede de la misma manera.

**CVwl (obtenido) < CVwl (fabricante) = Verificación de precisión en condiciones intralaboratorio aceptada.**

En caso de ser rechazado: Verificación extendida.

**CVwl(obtenido) < UVR CVwl = Verificación de precisión en condiciones intralaboratorio aceptada.**

El criterio para utilizar los valores de UVR CVr y UVR CVwl es que el fabricante realizó un protocolo con un número mayor de datos ( n= 80) y en este trabajo se verifica con un número menor (n=25) .

UVR CVr y CVwl del fabricante se estiman a partir del CVr y CVwl fabricante y la distribución chi cuadrada.

## **Estimación del sesgo**

Este protocolo tiene como objetivo estimar la proximidad entre la media de los 25 datos obtenidos y un valor de referencia o valor verdadero (VV). Se debe tener en cuenta que las concentraciones de los materiales deben estar próximas o representar niveles de decisión médica y además buscar el material con la menor incertidumbre asociada a la asignación del valor verdadero.

## **Veracidad estadística:**

- Debemos obtener la mejor estimación del VV de la muestra.
- Debemos estimar un intervalo de verificación para el VV.

- Debemos verificar si la media del laboratorio está incluida en el intervalo de verificación del VV.

Intervalo de verificación (IV) :

$$\mathbf{IV\ 95\% = VV \pm t * se_c}$$

VV: Valor evaluado o mejor estimación del valor verdadero de la muestra

t: t de Student para 0.95 grados de libertad combinados

se<sub>c</sub>: Error estándar combinado

Entonces si la media obtenida está incluida en el intervalo la verificación es aceptada, si la media no está incluida la verificación es rechazada.

### **Veracidad clínica**

Para este protocolo debemos estimar el sesgo del procedimiento de medida en unidades de concentración, luego debemos calcular el Esa en unidades de concentración, por último comparamos estos valores.

$$\mathbf{Sesgo(c) = X - VV}$$

$$\mathbf{Esa(c) = p/100 * ETa(c)}$$

Entonces si el sesgo en unidades de concentración es menor o igual a el error sistemático admitido Esa(c) decimos que el sesgo no es clínicamente significativo, caso contrario el sesgo es clínicamente significativo.

**Sesgo(c) < Esa(c) Veracidad clínica aceptada**

**Sesgo(c) > Esa(c) Veracidad clínica no aceptada**



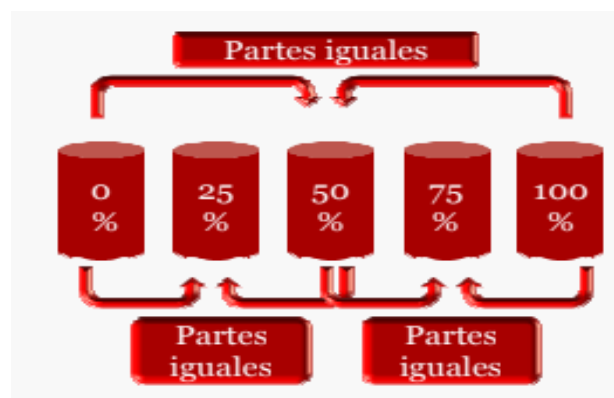
## EP 6 A: Linealidad<sup>16,17</sup>

En este protocolo se ensayan una serie de muestras de concentración conocida, o una serie de muestras diluidas. Las muestras o diluciones deben cubrir la mayor parte del rango de medición analítico del procedimiento de medida seleccionado, para ello se puede utilizar como material de medida estándares comerciales, soluciones comerciales, muestras de pacientes o muestras suplementadas.

Para el caso de una serie de diluciones se debe utilizar como diluyente solución fisiológica, o diluyente recomendado por el fabricante.

Para la verificación de la linealidad especificada por el fabricante se debe obtener de 5 a 7 niveles de concentración y analizarlo por duplicado o triplicado preferentemente.

Para utilizar muestras de pacientes se debe encontrar una con la mayor concentración posible para poder cubrir la mayor parte del rango de medición. Para esto se utiliza el protocolo de diluciones equidistantes.



**Figura 5:** Esquema de diluciones equidistantes de 5 niveles

A partir de los datos se evalúa la curva obtenida en un gráfico, en donde el eje de las abscisas representa las distintas concentraciones asignadas y en el eje de las ordenadas las concentraciones obtenidas.

Si la ecuación es de orden 1 ( $Y = mX + b$ ) el Procedimiento de medida es estadísticamente y clínicamente lineal en el rango evaluado. Si por el contrario es de orden 2, 3 o 4 el

procedimiento de medida no es estadísticamente lineal en el rango evaluado y se debe evaluar la linealidad clínica estimando que el error de no linealidad no supere el 50% del  $E_t$ .

De esta manera evaluamos si el método es lineal cuando el valor medido es linealmente proporcional a la concentración real en la serie de diluciones generadas.

### **EP 28 A3: Verificación de intervalos de referencia** <sup>18,19</sup>

Esta guía establece procedimientos para verificar la implementación de los intervalos de referencia propuestos por el fabricante en nuestra población y que estos pueden ser utilizados para la correcta interpretación clínica. Para ello necesitamos muestras de 20 personas sanas a las cuales se les hace llenar un cuestionario que contenga los criterios de exclusión e inclusión a dicho protocolo.

Luego, se identifica el intervalo de referencia (IR) propuesto por el fabricante, se procesan las muestras y si no más de 2 valores (10 %) caen por fuera del IR, este se considera verificado para el laboratorio.

Si 3 a 4 (15 a 20%) valores caen fuera del IR propuesto, se considera error al seleccionar la población y se recomienda seleccionar y evaluar 20 pacientes nuevos.

Si 5 o más valores caen fuera el IR propuesto por el fabricante, el laboratorio debería considerar establecer su propio valor de referencia.

### **Materiales y métodos**

Para realizar este trabajo se utilizó el autoanalizador Cobas e-411 (tecnología electroquimioluminiscencia) con sus respectivos reactivos y controles, pipetas automáticas controladas y certificadas, guías con los protocolos EP 15 A3, EP 6 A2, Y EP 28 A3 (CLSI), planillas de cálculo, programa informático LinCkecker y materiales descartables.



**Ilustración 1:** Autoanalizador de electroquimioluminiscencia Cobas e411 de la marca Roche, pipetas automáticas p200 y p1000 calibradas y certificadas.

### **Principio del test:**

El test para la determinación de PTH intacta utiliza el principio de ensayo sándwich, en el que un anticuerpo monoclonal biotinilado reacciona con el fragmento N-terminal (1-37) mientras que un anticuerpo monoclonal marcado con quelato de rutenio reacciona con el fragmento C-terminal (38-84).

Los anticuerpos utilizados en este test reaccionan con epítopes de las regiones de los aminoácidos 26-36 y 37-42<sup>20</sup>.

### **Técnica sándwich.**

-1º incubación: 30 ul de la muestra, un anticuerpo monoclonal biotinilado anti-PTH y un anticuerpo monoclonal anti-PTH con quelato de rutenio forman un complejo sándwich.

-2º incubación: después de incorporar las micropartículas recubiertas de estreptavidina, el complejo formado se fija a la fase sólida por interacción entre la biotina y la estreptavidina

-Durante una incubación de 9 minutos, el antígeno de la muestra (30 ul), un anticuerpo monoclonal biotinilado anti-PTH y un anticuerpo monoclonal marcado con quelato de rutenio

reaccionan con micropartículas recubiertas de estreptavidina para formar un complejo sándwich que se fija a la fase sólida.

-La mezcla de reacción es trasladada a la célula de medida donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente con una solución de lavado. Al aplicar una corriente eléctrica controlada se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide con un fotomultiplicador.

-Los resultados se determinan mediante una curva de calibración generada específicamente para el instrumento a partir de una calibración de 2 puntos y una curva máster suministrada por el fabricante <sup>20,21</sup>.

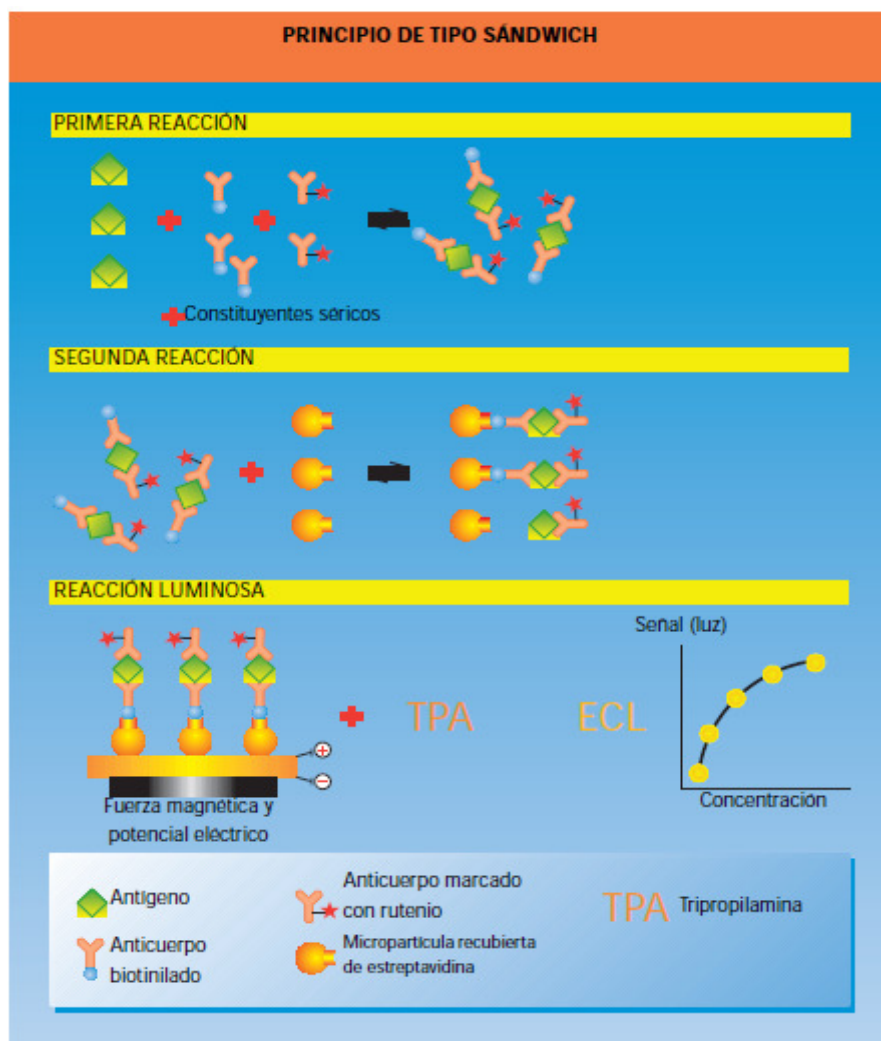


Figura 7: Principio tipo sandwich para cobas\_e411 <sup>21</sup>

## Resultados

### EP 15 A3

Para el protocolo EP 15 A3 se utilizó como material de estudio el control de calidad interno suministrado por el fabricante (PreciControl Varia) de dos niveles , para cada nivel se ensayaron 5 determinaciones de PTH durante 5 días consecutivos, obteniéndose los siguientes resultados.

#### Nivel 1

Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3	Corrida 4	Corrida 5
22/08/2022	23/08/2022	24/08/2022	25/08/2022	26/08/2022
60,53	62,67	59,32	62,29	61,66
60,54	62,30	62,49	62,00	62,23
61,92	63,10	61,62	63,00	61,78
61,55	63,65	62,09	62,64	61,11
59,65	63,73	60,34	62,48	61,11

Media: 61,83 pg/mL

DSr: 0.812 pg/mL

CVr: 1.31 %

DSwl: 1.18 pg/mL

CVwl: 1.91 %

#### Nivel 2

Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3	Corrida 4	Corrida 5
22/08/2022	23/08/2022	24/08/2022	25/08/2021	26/08/2022
200,40	205,40	204,90	198,50	202,50
207,10	207,70	205,80	200,50	209,40
204,00	208,30	203,50	205,60	209,80
207,10	209,30	203,30	205,20	205,30
204,50	207,20	201,90	199,30	205,30

Media: 204,87 pg/mL

DSr: 2.56 pg/mL

CVr: 1.25 %

DSwl: 3.209 pg/mL

CVwl: 1.57 %

Para los 25 datos, tanto del nivel 1 como para el nivel 2 se verificó estadísticamente (límite de Grubs) los posibles datos aberrantes y no fue necesario excluir ninguno de ellos.

A partir de los datos obtenidos se comparó con los datos suministrados en el inserto por el fabricante.

Datos del inserto.

Lote de Reactivo: 583612


Fecha de caducidad: 31/03/2031

Repetibilidad	Media	DE	CVr
Nivel 1	54,6 pg/mL	0.657 pg/mL	1.2 %
Nivel 2	182 pg/mL	2.43 pg/mL	1.3 %


Intralaboratorio	Media	DE	CVwl
Nivel 1	54.6 pg/mL	1.11 pg/mL	2.0 %
Nivel 2	182 pg/mL	3.14 pg/mL	1.7 %

Aplicando los criterios de verificación del protocolo se obtuvo:


### **Nivel 1 Repetibilidad**

$CV_r(\text{obtenido}) = 1.31\% > CV_r(\text{Fabricante}) = 1.2\%$  .  **Verificación rechazada**


Para este caso se debe aplicar la verificación extendida.

$CV_r(\text{obtenido}) = 1.31\% < UVL CV_r(\text{Fabricante}) = 1.57\%$   **Verificación aceptada**

### **Nivel 1 Precisión intralaboratorio (Total)**

$CV_{wl}(\text{obtenido}) = 1.91\% < CV_{wl}(\text{fabricante}) = 2.0\%$   **Verificación aceptada**

### **Nivel 2 Repetibilidad**

$CV_r(\text{obtenido}) = 1.25\% > CV_r(\text{fabricante}) = 1.3\%$   **Verificación rechazada**

$CV_r(\text{obtenido}) = 1.25\% < UVL CV_r(\text{fabricante}) = 1,75\%$   **Verificación aceptada**

### **Nivel 2 Precisión intralaboratorio (Total)**

$CV_{wl}(\text{obtenido}) = 1.57 < CV_{wl}(\text{fabricante}) = 1.7\%$   **Verificación aceptada**

### **Veracidad**

Para este protocolo se utiliza la media calculada con los mismos 25 datos de cada nivel y se los compara con los valores del control de calidad interno suministrado por el fabricante (valor verdadero) . De esta manera evaluamos la exactitud o sesgo del método.

Según el protocolo la incertidumbre asociada al valor verdadero ( $se_m$ ) asignado ( control de calidad interno) es cero.

Para estimar la veracidad estadística se establece el intervalo de verificación con la siguiente fórmula.

$$IV\ 95\% = VV \pm t * se_c$$

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

	Nivel 1	Nivel 2
Valor evaluado:	<b>64.4 pg/mL</b>	<b>215 pg/mL</b>
Se <sub>rm</sub> :	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>
Media obtenida:	<b>61.83 pg/mL</b>	<b>204.87 pg/mL</b>
Se <sub>x</sub>	<b>0.42</b>	<b>1.0</b>
Se <sub>c</sub>	<b>0.42</b>	<b>1.0</b>
Valor inferior	<b>62.93 pg/mL</b>	<b>211.03 pg/mL</b>
Valor superior	<b>65.87 pg/mL</b>	<b>218.96 pg/mL</b>
IV 95%	<b>62.93-65.87</b>	<b>211.03-218.96</b>

Para los dos niveles las medias obtenidas no pertenecen al intervalo de verificación, por este motivo se consideran rechazadas estadísticamente.



## Veracidad clínica

Este protocolo sirve para determinar qué tan alejado estamos del valor verdadero y si esta diferencia es clínicamente significativa.

Para ello utilizamos el valor de requisito de calidad elegido y en base a este asignamos un presupuesto de error del 50% (Esa(c)) , el cual no debe superar el sesgo calculado en unidades de concentración.

### Nivel 1

Esa(C) : 9.66 pg/mL

Sesgo(C): -2.57 pg/mL

**-2.57 pg/mL < 9.66 pg/mL**  **Sesgo clínicamente no significativo**

### Nivel 2

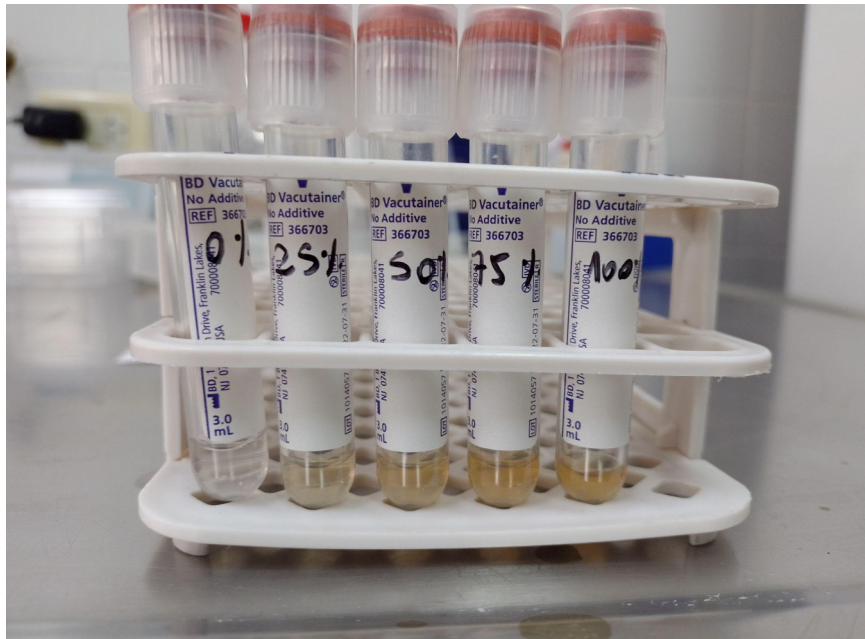
Esa(C): 32.25 pg/mL

Sesgo(C): -10.13

**-10.13 pg/mL < 32.25 pg/mL**  **Sesgo clínicamente no significativo**

## EP 6 A 3: Resultados

Para realizar este protocolo se utilizó como punto de partida una muestra de concentración elevada ( la más cercana al límite de cuantificación propuesta por el fabricante) a la cual se le realizó una serie de diluciones equidistantes obteniendo 5 niveles, a cada uno de estos fue ensayada por triplicado la determinación de PTH en el autoanalizador Cobas e411.



**Ilustración 2:** Diluciones equidistantes de 5 niveles.

Idealmente se debe contar con una muestra que cubra el mayor rango de medición propuesto por el fabricante (1.20 -5000pg/mL), en nuestro caso pudimos encontrar una muestra cercana a 3000 pg/ml (2881.7 pg/ml), de esta manera evaluamos la curva hasta este punto.

Los datos fueron analizados por el programa informático LinCkecker el cual realiza la verificación lineal tanto estadística como clínica.

Resultados:

Dil.	Assigned	Replic 1	Replic 2	Replic 3
1	0	0.0	0.0	0.0
2	720.425	720.0	722.9	729.6
3	1440.85	1485.0	1545.0	1537.0
4	2161.28	2133.0	2126.0	2140.0
5	2881.7	2808.0	2921.0	2913.0

**Figura 8:** Resultados de las concentraciones teóricas y observadas

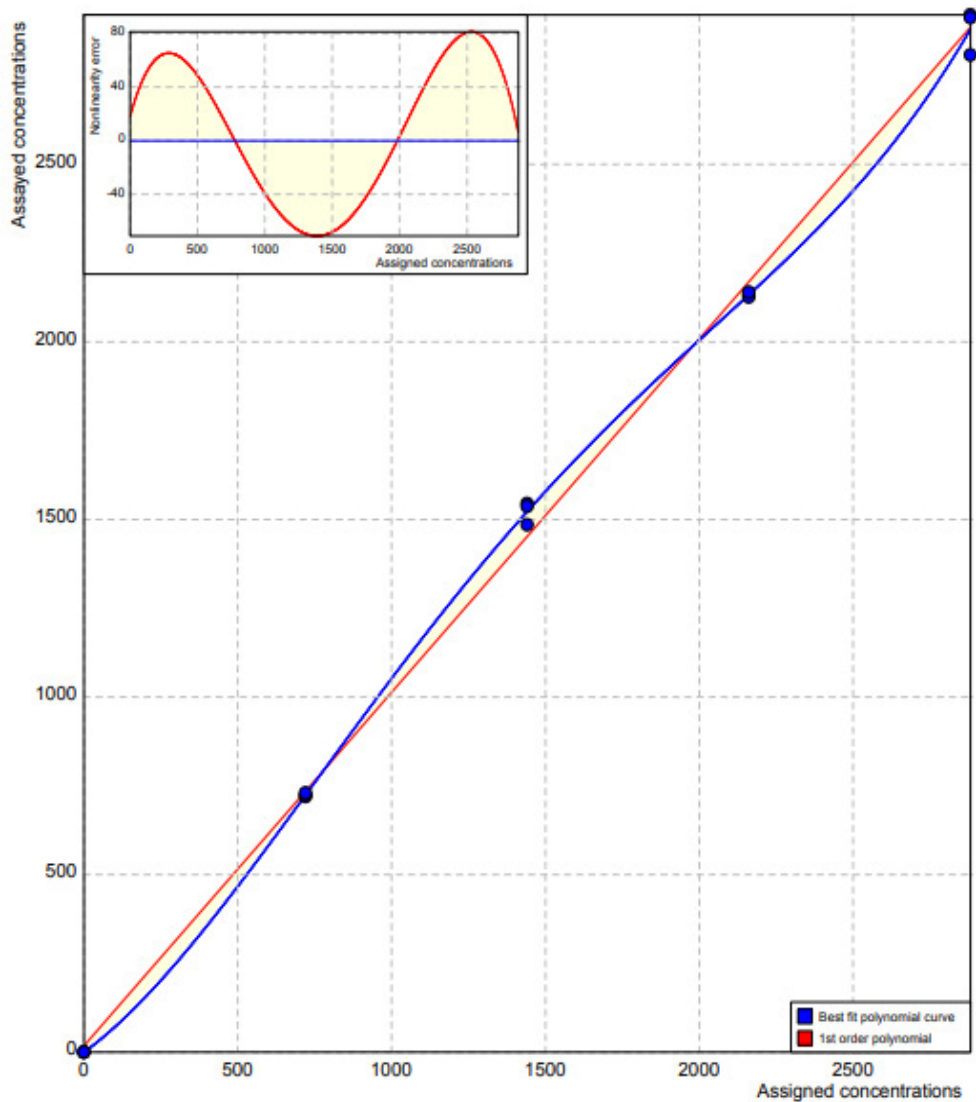
Se puede observar gráficos en donde el eje X representa los valores teóricos y el eje Y representa los valores obtenidos, la línea roja representa la recta de referencia y la línea azul la regresión polinomial . La curva hallada que mejor ajusta todos los puntos es de orden 4 (figura 8) , de esta manera se dice que la curva no es lineal estadísticamente. Debido a esto el programa realiza un segundo análisis de los datos (error de no linealidad) donde compara todas las desviaciones elementales a la linealidad, el cual da un valor de 3.3 % ( figura 7). Este valor se compara con el 50% del ETa que en nuestro caso es 15 %, basándonos en el requisito de calidad elegido. De esta manera podemos decir que el rango evaluado es clínicamente lineal.

Nonlinearity error	Peak X=2532	Overall (EK)	Unit
Dimensional	81.07	51.13	
Relative	3.30	1.77	%

**Figura 9:**Error de no linealidad.

Graph	Nonlinearity	Polynomials				
Best fit polynomial regression : $y = -0.001778 + 0.6295x + 0.0008407x^2 - 5.084E-7x^3$						
Coefficient	Value	SE	t-test	Probability	Significance	SE of regress.
<b>Order 1</b>						
$b_0$	18	21.61	0.833	0.420	NS	
$b_1$	0.9953	0.01225	81.267	0.000	S	48.33
<b>Order 2</b>						
$b_0$	-2.071	25.35	-0.082	0.936	NS	
$b_1$	1.051	0.04169	25.209	0.000	S	
$b_2$	-1.934E-5	1.387E-5	-1.394	0.189	NS	46.66
<b>Order 3</b>						
$b_0$	-8.371	27.29	-0.307	0.765	NS	
$b_1$	1.114	0.09638	11.555	0.000	S	
$b_2$	-8.003E-5	8.494E-5	-0.942	0.366	NS	
$b_3$	1.404E-8	1.937E-8	0.725	0.484	NS	47.61
<b>Order 4</b>						
$b_0$	-0.001778	18.46	0.000	1.000	NS	
$b_1$	0.6295	0.1431	4.400	0.001	S	
$b_2$	0.0008407	0.0002493	3.373	0.007	S	
$b_3$	-5.084E-7	1.383E-7	-3.676	0.004	S	
$b_4$	9.064E-11	2.389E-11		0.004	S	31.97

**Figura 10:** Análisis de regresión polinomial.



**Figura 11:** Regresión polinomial

### **EP 28 A3: Resultados**

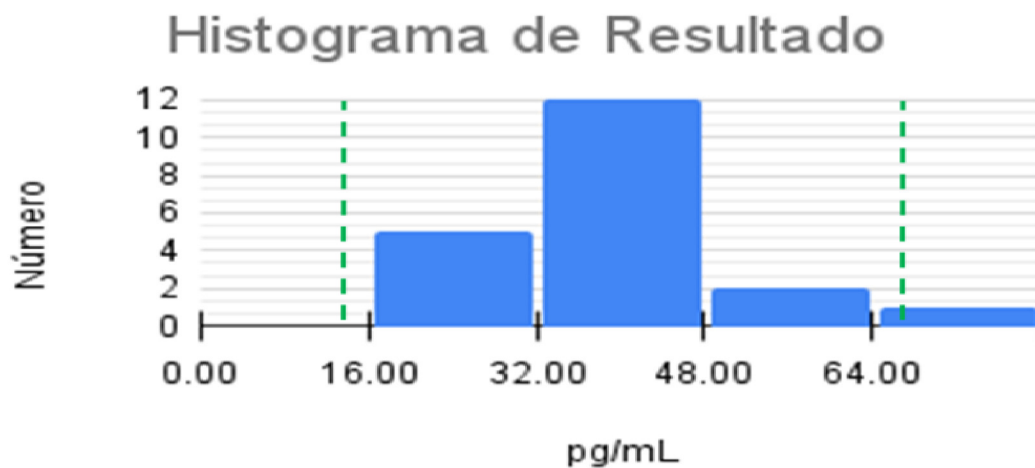
Para este protocolo se seleccionaron 20 individuos sanos según criterios de inclusión y exclusión, los cuales completaron una encuesta con dichos criterios y firmaron un consentimiento para participar del protocolo.

A cada uno de ellos se les realizó la determinación de PTH en el autoanalizador Cobas e411 y se comparó los valores obtenidos con el intervalo de referencia propuesto por el fabricante (15-65 pg/mL) arrojando los siguientes resultados.

Nº	ID	Resultado	Aceptado	Excluido
1	1152887	53.9	SI	
2	1154628	43	SI	
3	1152568	53.92	SI	
4	1153280	30.56	SI	
5	1154626	41.76	SI	
6	1151162	31.06	SI	
7	1151184	21.54	SI	
8	1152929	41.47	SI	
9	1151137	28.53	SI	
10	1152560	32.87	SI	
11	1152284	38.45	SI	
12	1152211	34.92	SI	
13	1151441	46.59	SI	
14	1147653	32.69	SI	
15	1149069	32.34	SI	
16	1146778	79.34	NO	SI
17	1149071	47.28	SI	
18	1151180	30.65	SI	
19	1149070	35.96	SI	
20	1146774	46.88	SI	

**Figura 12:** Datos analíticos

Intervalo de referencia a verificar : 15-65 pg/mL



**Figura 13:** Histograma de frecuencias

SD	12.62
Media	40.19
Mediana	37.21
Valor mínimo	21.54
Valor máximo	79.34

**Figura 14:** Análisis estadístico

De los 20 datos analizados solo 1 estuvo fuera del IR propuesto ( menos del 10 % ), esto quiere decir que dicho intervalo fue verificado para la población que acude al Laboratorio de Análisis Clínicos del hospital El Cruce y puede ser utilizado para su correcta interpretación y valoración clínica.

## **Conclusiones:**

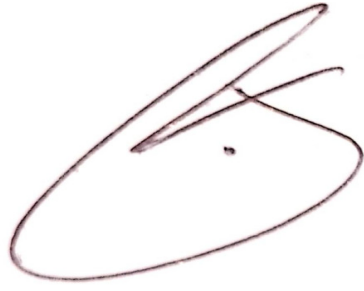
Es una buena práctica de los laboratorios de análisis clínicos, realizar la verificación de las especificaciones declaradas por el fabricante y así demostrar que se cumplen en nuestras condiciones de trabajo.

Con respecto al protocolo EP 15 A3 se verificó con éxito la precisión tanto en condiciones de repetibilidad interlaboratorio( día a día) , como la precisión intralaboratorio (total), para los dos niveles de decisión médica ensayados. Vale aclarar que para el caso de la repetibilidad se tuvo que utilizar la verificación extendida. Para la estimación de la veracidad, si bien el análisis estadístico no fue aceptado, se comprobó que el sesgo no es significativo clínicamente y que los resultados pueden ser utilizados sin invalidar su utilidad clínica. En resumen verificamos que los resultados de PTH son precisos y exactos.

En cuanto al protocolo EP 6 A pudimos comprobar que la técnica si bien no es lineal estadísticamente, el error de no linealidad no es clínicamente significativo y podemos entregar resultados seguros y confiables en un amplio rango de medida ( 1.2 - 3000.0 pg/mL), esto nos parece muy relevante ya que la PTH es un importante biomarcador de diversos trastornos de la glándula paratiroidea y del metabolismo óseo que deriva en valores muy reducidos o valores muy elevados de dicha hormona. Además debido a su corta vida media, en cirugías de resección de las glándulas se evalúa el éxito del procedimiento de acuerdo a un cierto porcentaje de disminución de secreción de la misma.

Al evaluar el protocolo EP 28 A3 pudimos verificar con éxito que el intervalo de referencia propuesto por el fabricante es válido para utilizar en la población que acude al Laboratorio de analisis clinicos del Hospital el Cruce, ya que de los 20 individuos sanos a los cuales se les determinó la PTH en suero solo 1 cayó por fuera del IR propuesto (menos del 10%).

En resumen, cabe destacar la importancia de realizar las verificaciones de las especificaciones del fabricante por parte de los laboratorios clínicos. Esto nos permite asegurar que se cumplen las condiciones de trabajo que propone el fabricante al momento de la validación del ensayo. Contar con un ensayo verificado en cuanto a precisión, exactitud, linealidad e intervalo de referencia, sumado a una correcta planificación de control de calidad interno y externo nos permite entregar resultados en el día a día asegurando la utilidad clínica de los mismos. A su vez, al ser un centro de trasplante renal, la parathormona es un analito de suma utilidad en el seguimiento de nuestros pacientes.

A handwritten signature in red ink, consisting of a large, stylized loop with a smaller loop on top and a horizontal stroke across the middle.

**Firma:**

**Aclaración: Fernando Ariel Gonzalez**

**DNI: 27687031**



## Referencias Bibliográficas:

- <sup>1</sup> Souberbielle JC, Roth H, Fouque D.(2010) Parathyroid hormone measurement in CDK. *Kidney Int.*
- <sup>2</sup> Greenspan F, Gardner D. (2005), *Endocrinología básica y clínica* 6ta Edición, España, Editorial Manuel Moderno.
- <sup>3</sup> Hammer G.,McPhee S. (2015), *Fisiopatología de la enfermedad* 7ma Edición, España, Editorial McGraw Hill.
- <sup>4</sup> Koeppen B,Stanton B. (2009), *Berne y Levy Fisiología Sexta Edición*,España, Editorial Elsevier.
- <sup>5</sup> Henry J. (2007), *El Laboratorio en el Diagnóstico Clínico*, España, Editorial Marbán.
- <sup>6</sup> Perinetti H.A *Hiperparatiroidismo primario, secundario y terciario (2005): actualización* *Revista Médica Universitaria*, Volumen 1, Número 1,ISSN 1669-8991
- <sup>7</sup> Frigeri A. *Hiperparatiroidismo 2º y 3º Enfermedad ósea asociada a la enfermedad renal crónica.*
- <sup>8</sup> Gallardo A. (2019, 28 de febrero), *¿Qué es la CLSI?*  
<https://bioanalisaldia.com/tema-de-hoy/que-es-la-clsi/>
- <sup>9</sup> Clinical & Laboratory Standards Institute: CLSI Guidelines. (s.f.) recuperado de <https://clsi.org>
- <sup>10</sup> López J.F., (2017) *Desviación estándar o típica*. Economipedia.com
- <sup>11</sup> Villagra, Andrea. *Como trabajar en calidad y no morir en el intento.*
- <sup>12</sup> Sanjuán F.J., (2017) *Coefficiente de variación*. Economipedia.com
- <sup>13</sup> Westgard QC Quality Requirements (s.f.) recuperado de <https://westgard.com/>
- <sup>14</sup> CLSI. *User Verification of Precision and Estimation of Bias; Approved Guideline—Third Edition*. CLSI document EP15-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.

<sup>15</sup> Balbona M., Romañano V.(2017) Verificación de la precisión y estimación del sesgo. Co.Re.Bio.

<sup>16</sup> Wayne, Pa: NCCLS, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach ". Approved guideline NCCLS document EP6-A (ISBN1-56238-498-8). 2003.

<sup>17</sup> Gimenez J; Giorgini MF; Mladin J; Ligorria S, "Verificación del intervalo de medición de un método diazo para dosar bilirrubina sérica en un hospital público polivalente de la provincia de Córdoba"

<sup>18</sup> Clinical and Laboratory Standards Institute. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; proposed guideline—Third Edition CLSI document C28-P3. Wayne: CLSI; 2008

<sup>19</sup> Lazo Callupe Yaniz Carol1, López Peña Abigail Ester Título: Verificación de intervalos de referencia de analitos más frecuentes en el área de Química Clínica en el laboratorio del Centro Médico Naval

<sup>20</sup> Metodica Elecsys PTH (s.f.), recuperado de <https://dialog1.roche.com/es/es/elabdoc/>

<sup>21</sup> Cobas e411 compendio de información básica (s.f.) recuperado de [http://www.laboratorioscepc.com/cobas\\_e411.pdf](http://www.laboratorioscepc.com/cobas_e411.pdf)

## **Glosario**

**CLSI:** Instituto de estándares para el laboratorio.

**CV:** Coeficiente de variación.

**CVr:** Coeficiente de variación en condiciones de repetibilidad.

**CVwl:** Coeficiente de variación en condiciones intralaboratorio, total o intermedia.

**DS:** Desvío estándar.

**DSr:** Desvío estándar en condiciones de repetibilidad.

**DSwl:** Desvío estándar en condiciones intralaboratorio, total o intermedia.

**EA:** Error aleatorio.

**ECLIA:** Electroquimioluminiscencia.

**ERC:** Enfermedad renal crónica.

**ES:** Error sistemático.

**ES%:** Error sistemático porcentual.

**ESa:** Error sistemático admitido.

**ESa(C):** Error sistemático admitido en unidades de concentración.

**ETa:** Error total admitido.

**HPT:** Hiperparatiroidismo.

**IR:** Intervalo de referencia.

**IV:** Intervalo de verificación del valor evaluado.

**LEC:** Líquido extracelular.

**PTH:** Paratohormona.

**RSVI:** Region sanitaria sexta.

**Se<sub>c</sub>:** Error estándar combinado.

**Sesgo(C):** Valor estimado de un error sistemático en unidades de concentración.

**Se<sub>rm</sub>:** Error estándar del valor evaluado.

**Se<sub>x</sub>:** Error estándar de la media del laboratorio.

**UVR CVr:** Límite superior de verificación para el CVr estimado a partir de la especificación del fabricante tomado del inserto.

**UVR CVwl:** Límite superior de verificación para el CVwl estimado a partir de la especificación del fabricante tomado del inserto.

**VV:** Valor verdadero.