

# **DIRECTRIZ PARA LA VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS DE ANÁLISIS CUALITATIVOS EN LOS LABORATORIOS CLÍNICOS**

Directive for the validation and verification of qualitative analysis procedures in the Clinical Laboratories

Versión 02

<b>Elaborado por:</b>  <b>Comité Técnico de Laboratorios Clínicos</b>  <b>2024-01-05</b>	<b>Revisado por:</b>  <b>Janett Acha Paredes</b> Coordinadora Responsable (e) de la Unidad Funcional Técnica en Acreditación  <b>Edwin Llamoca Domínguez</b> Coordinador Responsable (e) de la Unidad Funcional de Gestión en Acreditación	<b>Aprobado por:</b>  <b>Patricia Aguilar Rodríguez</b> Directora del INACAL-DA
--	--	--

## ÍNDICE

<b>Nº</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
1	OBJETIVO	3
2	ALCANCE	3
3	GENERALIDADES	3
4	DOCUMENTOS DE REFERENCIA	3
5	DEFINICIONES	4
6	CONSIDERACIONES GENERALES	7
6.1	VALIDACIÓN	8
6.2	PLANEACIÓN Y EJECUCIÓN DE LA VALIDACIÓN	8
6.3	VERIFICACIÓN	9
6.4	PLANEACIÓN Y EJECUCIÓN DE LA VERIFICACIÓN	10
7.0	DESARROLLO DE PARÁMETROS DE VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTO CUALITATIVOS	10
7.1	PRECISIÓN	10
7.2	SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNOSTICA	13
7.3	PORCENTAJE DE ACUERDOS POSITIVOS Y NEGATIVOS	19
7.4	LÍMITE DE DETECCIÓN Y VALOR DE CORTE	24
7.5	SELECTIVIDAD	28
<b>Nº</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>Pág.</b>
1	ANEXO 1: EJEMPLOS PARA EL DESARROLLO DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN	31
2	ANEXO 2: EJEMPLOS PARA EL DESARROLLO DE LOS PARÁMETROS DE VERIFICACIÓN	39

## 1. OBJETIVO

La presente directriz tiene por objeto brindar lineamientos y recomendaciones para la realización de la validación y verificación de los procedimientos de análisis cualitativos en los laboratorios clínicos conforme a los requisitos de la NTP ISO 15189:2023.

Esta directriz no reemplaza los requisitos y / o estándares internacionales aplicables al laboratorio siendo las recomendaciones que aquí se mencionan de libre aplicación por los laboratorios, sin embargo, son reconocidas por la Dirección de Acreditación (DA) del INACAL, como apropiadas para cumplir con los requisitos de la norma NTP ISO 15189:2023.

En cualquiera de los casos, es responsabilidad de los laboratorios clínicos, demostrar que las validaciones y/o verificaciones son suficientes para cumplir plenamente los requisitos normativos, basado en los elementos desarrollados en este documento.

## 2. ALCANCE

Esta directriz se aplica a los laboratorios clínicos acreditados, a aquellos que aspiren a una acreditación y a todos los laboratorios que busquen mejorar sus procesos analíticos.

## 3. GENERALIDADES

Este documento fue elaborado por el Sub comité Técnico de Aseguramiento de la Calidad en los procesos del Laboratorio Clínico de la Dirección de acreditación del INACAL.

Este documento tiene un enfoque práctico y didáctico para la realización de la validación y verificación de los procedimientos de análisis cualitativos en los laboratorios clínicos, que requieran aplicar criterios uniformes y consistentes con el fin de brindar sus servicios con seguridad técnica en el marco del cumplimiento de la NTP 15189:2023 y que esto repercuta en un resultado de análisis clínico confiable en beneficio de la salud de las personas.

## 4. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

Los siguientes documentos de referencia han sido consultados para la elaboración de esta directriz. Para las referencias con fecha sólo se aplica la edición citada. Para las referencias sin fecha se aplica la última edición del documento (incluyendo cualquier modificación).

- Burd Eileen M., Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Diseases, American Society for Microbiology, Clinical Microbiology Reviews, p. 550–576, 2010.
- Camaró Sala María Luisa, Catalá Cuenca Vicente, Gimeno Cardona Concepción, Martínez García Rosana, Olmos Martínez Piedad, Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 48. Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. 2013
- CLSI EP 07 Interference Testing in Clinical Chemistry, Third Edition, 2018
- CLSI EP 12 User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance, Third Edition, 2023
- CLSI EP 15 A3 User verification of Precision and Estimation of Bias; Approved Guideline – Third Edition, 2014.

- NTP ISO 15189:**2023**. Laboratorio Clínico: Requisitos particulares para la calidad y competencia, 2023.
- Pum Joachim, A practical guide to validation and verification of analytical methods in the clinical laboratory, 2019, Advances in Clinical Chemistry, Volume 90, ISSN 0065-2423.
- Ruisánchez Itziar, Trullols Esther, Rius F. Xavier, Validación de métodos analíticos cualitativos, 2003, Técnicas de laboratorio N°. 281, 2003, págs. 328-335, ISSN 0371-5728.
- Servicio de Acreditación Ecuatoriano (SAE), Guía Validación de métodos de ensayo en laboratorios clínicos (G03 R00), 2018.
- U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Devices and Radiological Health, Policy for Diagnostic Tests for Coronavirus Disease-2019 during the Public Health Emergency, March 2020.
- Vocabulario Internacional de Metrología (VIM), Conceptos básicos y generales, y términos asociados, 3ª Edición, 2012.
- Westgard James, Validación Básica de Método, primera edición, 2013.

**Nota: La aplicación de las guías actualizadas no invalida la aplicación de las versiones anteriores hasta con una antigüedad de 8 años.**

## 5. DEFINICIONES

Además de las definiciones siguientes, para los fines de este documento son aplicables las definiciones de la Norma NTP ISO 15189.

**5.1. Análisis:** Conjunto de operaciones que tienen por objeto determinar el valor o las características de una propiedad. (NTP-ISO 15189)

**Nota:** Los análisis de laboratorio a menudo también se llaman ensayos o pruebas.

**5.2. Análisis Cuantitativo:** Conjunto de operaciones que determinan el valor de una propiedad (NTP-ISO 15189).

**Nota:** El valor de medición está en relación directa con una cantidad o actividad del mensurando.

**5.3. Análisis Cualitativo:** Conjunto de operaciones que determinan las características de una propiedad (NTP-ISO 15189).

**Nota:** El resultado es obtenido por la lectura de la reacción que da un observador, a través de la comparación con controles positivos o negativos.

**5.4. Condición de interés // condición objetivo // evento de interés:** Una enfermedad particular, una etapa de la enfermedad, estado de salud o cualquier otra condición identificable o característica de interés dentro de un tema, como la escenificación de una enfermedad que ya se sabe que está presente, o una condición de salud que podría provocar una acción clínica, como la iniciación, modificación o finalización del tratamiento (CLSI EP12).

**5.5. Criterio de Exactitud Diagnóstica:** Son los mejores criterios actualmente disponibles para establecer la presencia o ausencia de la condición, evento o característica de interés usando un

único método o combinación de métodos que incluye pruebas de laboratorio, pruebas de imágenes, patología e información clínica, incluido el seguimiento (CLSI EP12).

**5.6. Especificidad *clínica*:** Es la proporción de sujetos que no tienen un trastorno clínico específico (o condición de interés), cuyos resultados de la prueba sean negativos o dentro del límite de decisión definido (CLSI EP12).

**Nota:** Antes llamada especificidad diagnóstica.

**5.7. Intervalo C5-C95:** Es el rango de concentraciones del análisis, alrededor del punto de corte, de modo que los resultados observados en las concentraciones fuera de este intervalo son consistentemente negativas (concentraciones <C5) o consistentemente positivas (concentraciones >C95);

**Nota:** Los resultados observados en concentraciones dentro de este intervalo no son consistentes debido a la imprecisión (CLSI EP12)

**5.8. Intervalo de No fiabilidad:** Zona alrededor del punto de corte que corresponde a un intervalo de valores donde pueden encontrarse falsos positivos y falsos negativos. (CLSI EP12).

**5.9. Falso Negativo:** Un resultado de prueba negativo para un sujeto en quien la condición de interés está presente (según lo determinado por los criterios de exactitud diagnóstica). (CLSI EP12).

**5.10. Falso positivo:** Resultado positivo de una prueba para un sujeto en quien la condición de interés está ausente (según lo determinado por los criterios de exactitud diagnóstica). (CLSI EP12).

**5.11. Incertidumbre:** Parámetro asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían atribuirse razonablemente al mesurando. (ISO/IEC GUM).

**5.12. Límite de Detección:** valor medido, obtenido mediante un procedimiento de medición dado, para el cual la probabilidad de declarar erróneamente la ausencia de un constituyente en un material es  $\beta$ , dada una probabilidad  $\alpha$  de declarar erróneamente su presencia. (VIM).

**Nota 1:** La IUPAC recomienda por defecto los valores de  $\alpha$  y  $\beta$  iguales a 0,05.

**Nota 2:** En inglés algunas veces se usa la abreviatura LOD.

**Nota 3:** No debe utilizarse el término "sensibilidad" en lugar de "límite de detección"

**Nota 4:** También llamado "límite de detección" o "concentración mínima detectable" (o dosis o valor); a veces se usa para indicar la "sensibilidad analítica".

**Nota 5:** Una definición usada en los laboratorios para el LOD es la Concentración mínima de un analito en la matriz de una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo condiciones analíticas específicas.

**5.13. Magnitud:** Propiedad de un fenómeno, cuerpo o sustancia, que puede expresarse cuantitativamente mediante un número y una referencia. (ISO/IEC GUM).

**5.14. Mensurando:** Magnitud particular, objeto de medición. (ISO/IEC GUM)

**5.15. Método de medición:** Secuencia lógica de las operaciones, descritas de manera genérica, utilizada en la ejecución de las mediciones (VIM)

**5.16. Método de referencia:** Método ampliamente investigado, que describe clara y exactamente las condiciones y procedimientos necesarios, para la medición de uno o más valores de la propiedad, que han demostrado tener exactitud y precisión de acuerdo con su propósito de uso y que puede,

por lo tanto, ser usado para evaluar la exactitud de otros métodos por la misma medición, permitiendo en particular la caracterización de un Material de Referencia. (SAE **G03** R00).

- 5.17. Método desarrollado por el laboratorio:** Método analítico que no se encuentra en normas u otras colecciones de métodos, ni en publicaciones de terceros, habiendo sido desarrollado por el propio laboratorio. (SAE **G03** R00)

**Nota:** El desarrollo del método incluye la etapa de su validación.

- 5.18. Muestra desafiante:** Se consideran a las muestras desafiantes (o retadoras), aquellas que se encuentran en valores o lectura cercanas a niveles de decisión".

**Nota 1:** Un nivel de decisión por ejemplo puede ser considerado un Punto de Corte o un Límite de Detección.

- 5.19. Nota 2:** Para pruebas de Serología Infecciosa una muestra o control es considerado débil reactivo cuando su relación de positividad (S/CO) se encuentra entre 2 a 4 veces en valor de corte declarado para la prueba.

- 5.20. Parámetros de desempeño del método:** Son las propiedades, características o capacidades cuantificables del método que indican su grado de calidad; incluyen: exactitud, efecto de matriz, repetibilidad, reproducibilidad, sensibilidad, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, intervalo analítico, sensibilidad, robustez. Todas estas características relacionadas con los resultados obtenidos. (SAE **G03** R00)

**Nota:** Rendimiento es considerado equivalente a Desempeño.

- 5.21. Porcentaje de Acuerdos:** Los términos de porcentaje de acuerdo positivo y de porcentaje de acuerdo negativo se utilizan, si el comparador no cumple con el criterio de exactitud diagnóstica.

**Nota 1:** El porcentaje de acuerdo positivo también es conocido como sensibilidad relativa.

**Nota 2:** El porcentaje de acuerdo negativo también es conocido como especificidad relativa.

- 5.22. Precisión:** Es el grado de concordancia entre los resultados del ensayo obtenidos independientemente bajo condiciones estipuladas. (NTP-ISO 5725-I)

**Notas:**

- La precisión sólo depende de la distribución de los errores aleatorios y no se relaciona con el valor verdadero o el específico.
- La precisión se expresa usualmente en términos de la imprecisión y se calcula como la desviación estándar de los resultados del ensayo. Una menor precisión está reflejada por una mayor desviación estándar
- "Los resultados del ensayo obtenidos independientemente" se refieren a los resultados obtenidos de manera que no han sido influenciados por cualquier resultado anterior en el mismo o similar objeto de ensayo. Las medidas cuantitativas de precisión dependen críticamente de las condiciones estipuladas. Las condiciones de repetibilidad y reproducibilidad son situaciones particulares en condiciones extremas.

- 5.23. Precisión Intermedia:**

Precisión de medición bajo un conjunto de condiciones de precisión intermedia. Condición de medición, dentro de un conjunto de condiciones que incluye el mismo procedimiento de medición, el mismo lugar y mediciones repetidas del mismo objeto u objetos similares durante un periodo amplio de tiempo, pero que puede incluir otras condiciones que involucren variaciones. (VIM)

**Notas:**

- 1.- Las variaciones pueden comprender nuevas calibraciones, patrones, operadores y sistemas de medición.
- 2.- Conviene que, en la medida de lo posible, una especificación sobre las condiciones indique qué condiciones cambiaron y cuáles no.
- 3.- En química, el término "condición de precisión inter-serie" se utiliza algunas veces para referirse a este concepto.

- 5.24. Recuperación:** La recuperación es el cociente entre la cantidad del mensurando medida y el contenido en la muestra. En el caso ideal, se obtiene un 100%. En mediciones experimentales puede perderse el mensurando especialmente en el caso de tratamientos complejos de muestras con el mensurando en cantidades traza, dando lugar a porcentajes de recuperación menores (importante especialmente en el caso de procedimientos cromatográficos). (SAE G04 R00)
- 5.25. Repetibilidad:** Es el grado de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas obtenidas bajo condiciones de repetibilidad. Es decir, es la medida de la precisión en condiciones bajo las cuales se obtienen resultados independientes de una prueba con el mismo método, con los mismos accesorios de laboratorio, en el mismo laboratorio, por el mismo operador usando el mismo equipo en intervalos de tiempo cortos. (NTP-ISO 3534-1)
- 5.26. Reproducibilidad:** Es la precisión donde los resultados del ensayo son obtenidos con el mismo método sobre materiales de ensayo idénticos, en diferentes laboratorios con diferentes operadores usando equipos diferentes. (NTP-ISO 5725-1)
- 5.27. Selectividad:** La capacidad de un método de ensayo para determinar exacta y específicamente el mensurando de interés en la presencia de otros componentes en la matriz bajo condiciones establecidas de prueba.  
**Nota:** Otro término empleado para referirse a la selectividad es la **especificidad analítica**, aunque debe utilizarse para aquellas situaciones donde el resultado obtenido se puede producir con una única entidad química. (nota 1, selectividad VIM)
- 5.28. Sensibilidad *clínica*:** Es la proporción de pacientes con un trastorno clínico bien definido (o condición de interés), cuyos resultados de la prueba sean positivos o excedan un límite de decisión definido. Es decir, un resultado positivo e identificación de los pacientes que tienen una enfermedad. (CLSI EP12)  
**Nota:** Antes llamada sensibilidad diagnóstica.
- 5.29. Validación:** Confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos del método para una utilización o aplicación específica prevista.
- 5.30. Valor de corte:** Para una prueba cualitativa, el umbral por encima del cual el resultado se informa como positivo y por debajo del cual el resultado se informa como negativo. Algunas literaturas también se le conoce como punto de corte. (CLSI EP12)  
**Nota:** En algunas pruebas los resultados por encima del umbral son negativos y por debajo positivos. Por ejemplo, el Anti-HBc en algunas marcas de reactivos.
- 5.31. Valor predictivo positivo (VPP) –** Es el porcentaje (número o fracción multiplicada por 100) de sujetos con un resultado de prueba positivo que tienen la condición objetivo (determinado por los criterios de exactitud diagnóstica).  
**Nota:** El VPP debe interpretarse en contexto con la prevalencia de la condición de interés (según lo determinado por los criterios de exactitud diagnóstica).
- 5.32. Valor predictivo negativo (VPN) -** Es el porcentaje (número o fracción multiplicada por 100) de sujetos con un resultado de prueba negativo que no tienen la condición objetivo (determinado por los criterios de exactitud diagnóstica).  
**Nota:** El VPN debe interpretarse en contexto con la prevalencia de la condición de interés (según lo determinado por los criterios de exactitud diagnóstica).

**5.33. Verificación:** Confirmación mediante la aportación de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos especificados para un método. La verificación consiste en evaluar el desempeño del método para demostrar que cumple con los requisitos para el uso previsto, que fueron especificados como resultado de su validación.

## 6. CONSIDERACIONES GENERALES

La evaluación de los análisis cualitativos suele ser binaria del tipo **POSITIVO/NEGATIVO, REACTIVO/NO REACTIVO** indicando la presencia o ausencia de un determinado microorganismo, compuesto químico, anticuerpo o antígeno.

Existen dos grandes grupos de sistemas de medida cualitativos: análisis cualitativo sensorial y análisis cualitativo instrumental.

### a) Análisis cualitativo Sensorial

La interpretación del análisis es netamente sensorial y se realiza en base a los sentidos humanos principalmente la vista. El cual se basa en la aparición de un determinado color, aglutinación, presencia de una determinada célula, reacción química, inmunológica, etc.

En este tipo de sistema la respuesta binaria es, SI o NO y se obtiene de forma directa, sin ningún tratamiento de los datos. Dentro de este grupo se encuentran las pruebas serológicas en caset, tiras, que son dispositivos médicos comerciales diseñados para una aplicación concreta que contiene todos los reactivos necesarios y en algunos casos incluye un sistema instrumental sencillo, que brinda un resultado rápido.

### b) Análisis cualitativo Instrumental

Se realiza en base a una medida instrumental (colorimetría, quimioluminiscencia, etc.), esta medida que se obtiene debe transformarse en respuesta binaria del tipo POSITIVO/NEGATIVO y por lo tanto implica un tratamiento de datos. Primero hay que establecer la respuesta instrumental, por ejemplo, un valor de absorbancia para la concentración correspondiente al valor al que se requiere cribar (establecido por el laboratorio) y debe compararse con la respuesta instrumental obtenida para cada muestra. Si es superior, al umbral la respuesta binaria es POSITIVO, y si el valor es inferior la respuesta binaria es NEGATIVO. En algunas pruebas los resultados por encima del umbral son negativos y por debajo positivos. Por ejemplo, el Anti-HBc en algunas marcas de reactivos.

## 6.1. VALIDACIÓN:

Es la comprobación del cumplimiento de los requisitos del procedimiento de análisis para la utilización o aplicación específica prevista. Los resultados de la validación son informados usualmente por el fabricante en los instructivos de uso de los reactivos del método de análisis.

La validación de procedimientos de análisis sólo deberá realizarse cuando:

- El laboratorio realiza modificaciones a procedimientos ya validados o fuera del alcance del uso previsto por el fabricante.
- El laboratorio utiliza procedimientos de análisis desarrollados por ellos mismos.

## 6.2. PLANEAMIENTO Y EJECUCIÓN DE LA VALIDACIÓN:

En el planeamiento y ejecución de validación de los análisis clínicos, se sugiere una secuencia de trabajo como la que se muestra a continuación:



- a) Definir objetivo, campo de aplicación o alcance del análisis clínico, la(s) norma(s) o documento(s) que le(s) da(n) origen y las modificaciones efectuadas a dicho(s) documento(s)<sup>1</sup>;
- b) Definir los parámetros de validación y criterios de aceptación;
- c) Desarrollar un procedimiento operacional de validación;
- d) Definir los experimentos, ensayos o pruebas de validación;
- e) Verificar si las características de operación de los equipos con los que cuenta el laboratorio son compatibles con las exigidas por el análisis clínico en estudio;
- f) Caracterizar los materiales, por ejemplo, insumos y reactivos;
- g) Ejecutar los (experimentos/ ensayos/ pruebas) preliminares de validación;
- h) Ajustar los parámetros de validación del análisis clínico y los criterios de aceptación, si es necesario;
- i) Ejecutar los (experimentos/ ensayos/ pruebas) completos de validación;
- j) Preparar un procedimiento analítico para la ejecución del análisis clínico de rutina;
- k) Definir criterios de revalidación (por ejemplo: periodicidad; cambios de personal, condiciones ambientales, equipos; etc.)
- l) Definir tipo y frecuencia de verificación del control de calidad analítico del análisis clínico de rutina.
- m) Los (experimentos/ ensayos/ pruebas) y los resultados deben ser documentados y registrados.

La Dirección de acreditación (DA) ha estimado conveniente que, dependiendo de la naturaleza del procedimiento cualitativo a validar, los estudios de validación deben contener como mínimo la determinación de los siguientes parámetros:

- Precisión
- Sensibilidad y Especificidad ***Clínica*** (Cuando el comparador cumpla con el criterio de exactitud diagnóstica)
- Porcentaje de Acuerdo Positivos y Porcentaje de Acuerdo Negativos (Cuando el comparador no cumpla con el criterio de exactitud diagnóstica)
- Límite de Detección o Valor de corte
- Selectividad

**Nota1:** Para el desarrollo de los parámetros de validación se debe tener en consideración el uso de documentos de instituciones de reconocimiento nacional o internacional. Cabe indicar, que el laboratorio deberá sustentar técnicamente la aplicación o no de cada uno de los parámetros que han sido considerados aplicables de validación citados arriba.

**Nota2:** Los porcentajes de acuerdos sólo aplican para la validación cuando no se dispongan de muestras confirmadas con diagnóstico clínico o en situación de emergencia sanitaria.

### 6.3. VERIFICACIÓN

El laboratorio debe verificar que puede aplicar correctamente los procedimientos de análisis ya validados por el fabricante, previo a su uso y bajo sus condiciones propias de operación (equipo, calibradores, analistas, condiciones ambientales, etc.) generando evidencias objetivas, para confirmar su aplicación correcta. La verificación también se debe realizar cada vez que ocurra un cambio mayor en algún procedimiento de análisis que ya hubiera sido verificado anteriormente o

<sup>1</sup> Si la validación comprende modificación(es) de parte(s) de método(s) de ensayo normalizado (s), indicar claramente la(s) norma(s) de referencia y la(s) modificación(es) que se están realizando en ella(s)

cada vez que existan cambios mayores en el instrumento de medición (se consideran cambios mayores cuando se realice un cambio de equipo o un mantenimiento mayor, que afecte directamente a los componentes de medición instrumental y que haya requerido un retiro del equipo de las instalaciones donde habitualmente funciona). Además, se requerirá que una vez realizada la verificación del procedimiento, este se mantenga en monitoreo a través de sus programas de control interno y externo de la calidad.

#### **6.4. PLANEAMIENTO Y EJECUCIÓN DE LA VERIFICACIÓN:**

En el planeamiento y ejecución de la verificación de los análisis clínicos, se sugiere una secuencia de trabajo como la que se muestra a continuación:

- a. Antes de realizar la verificación del procedimiento de análisis se debe cumplir con la correcta calificación de instalación y operación del equipo de medición, además del entrenamiento de los usuarios que incluya un periodo de inducción.
- b. Seguir las instrucciones del fabricante para el uso de los equipos de medición, reactivos, consumibles y materiales de control, empleando instrumentos y equipos calibrados.
- c. Verificar el correcto funcionamiento de los equipos de medición, teniendo en consideración los registros de los mantenimientos diarios, correctivos (si hubiera) y los programas de mantenimiento preventivo.
- d. Emplear el mismo lote del material de control y en lo posible el mismo lote de reactivo para cada protocolo de verificación.
- e. Siempre que sea posible, las concentraciones de los materiales de control deberán estar cercanos a niveles de decisión clínica.
- f. Registrar la identidad de los analistas responsables en los informes finales.

La DA ha estimado conveniente que los estudios de verificación deben contener la determinación de por lo menos los siguientes parámetros:

- Precisión
- Sensibilidad y Especificidad **Clínica** (Cuando el comparador cumpla con el criterio de exactitud diagnóstica)
- Porcentaje de Acuerdo Positivos y Porcentaje de Acuerdo Negativos (Cuando el comparador no cumpla con el criterio de exactitud diagnóstica)

**Nota:** Si el laboratorio considera que alguno de los parámetros para la verificación de los procedimientos de análisis, no aplica en función al análisis seleccionado, esta decisión debe ser justificada técnicamente **y estar documentada debidamente.**

## 7. DESARROLLO DE PARÁMETROS DE VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS CUALITATIVOS

### 7.1 PRECISIÓN

El laboratorio debe evaluar la precisión de los análisis **cualitativos instrumentales** en dos condiciones:

- Precisión en condiciones de repetibilidad.
- Precisión en condiciones de precisión intermedia o intralaboratorio.

<b>Condiciones de repetibilidad:</b>	<b>Condiciones de precisión intermedia o intralaboratorio:</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• El mismo procedimiento de medida</li><li>• El mismo laboratorio</li><li>• El mismo equipo</li><li>• El mismo operador</li><li>• El mismo reactivo (lote/ envase) y la misma calibración</li><li>• Repeticiones en un intervalo corto de tiempo (dentro de una corrida analítica)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• El mismo procedimiento de medida</li><li>• El mismo laboratorio</li><li>• El mismo equipo</li><li>• El mismo operador o no</li><li>• Repeticiones en un intervalo prolongado de tiempo.</li></ul>

**Nota:** Es común la denominación de repetibilidad como precisión intracorrida o intraserie, en este caso las variables que pueden generar dispersión a nivel de los resultados se encuentran sumamente acotados.

#### **Condiciones Generales para evaluar la precisión:**

- ✓ Seleccionar los materiales a utilizar para llevar a cabo el protocolo.
- ✓ Se requiere dos materiales de control como mínimo (Positivo y/o Negativo)
- ✓ Se requiere que uno de los controles sea necesariamente positivo y tenga un valor cercano al punto de corte.
- ✓ En caso de emplear materiales de control se recomienda que sean conmutables a la matriz de las muestras según el uso previsto.

#### **Muestras para evaluar precisión:**

- 1.- Muestras de pacientes
- 2.- Pooles de muestras de pacientes
- 3.- Material de control (interno –interlaboratorial-EQA)

Se requiere dos materiales de control como mínimo que se encuentren de acuerdo con las especificaciones de precisión declaradas en las instrucciones del inserto o de los protocolos de validación del fabricante (Positivo y/o Negativo).

Fuentes:

- (1) <https://www.eflm.eu/files/efcc/Zagreb-Miler.pdf> (Documento en la European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine)
- (2) <https://resources.psmile.org/resources> (Universidad Johns Hopkins)
- (3) <http://www.clinlabnavigator.com/qualitative-assay-validation.html> (Consultores Internacionales)
- (4) Insertos de fabricantes (Abott, Roche, Siemens, entre otros)

### 7.1.1 Procedimiento:

❖ **Validación:**

**Para Repetibilidad:** Procesar cada material de control por lo menos 40 veces, en forma continua o 40 veces en el transcurso del día (24 h). A partir de estos resultados vamos a calcular la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación expresado en porcentaje.

**Para Precisión Intermedia:** Procesar cada material de control 40 veces; el proceso deberá realizarse por duplicado durante 20 días diferentes utilizando el mismo lote de control. A partir de estos resultados vamos a calcular la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación expresado en porcentaje.

**Nota 1:** El laboratorio también puede aplicar otros protocolos de validación como el protocolo propuesto por CLSI la EP5.A3 Evaluación de la Precisión de los procedimientos de medición cuantitativa.

❖ **Verificación:**

A) **Modelo 1: Según lo declarado por James Westgard:**

**Para Repetibilidad:** Procesar cada material de control por lo menos 20 veces, en forma continua o 20 veces en el transcurso del día (24 h). A partir de estos resultados calcular la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación expresado en porcentaje.

**Para Precisión Intermedia:** Procesar cada material de control 20 veces; el proceso deberá realizarse durante 20 días diferentes utilizando el mismo lote de control. A partir de estos resultados calcular la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación expresado en porcentaje.

B) **Modelo 2: Según lo declarado por la Guía del CLSI EP15-A3:**

**Para Repetibilidad:** Procesar cada material de control por quintuplicado (5 réplicas diarias), durante cinco días. A partir de estos resultados Calcular el coeficiente de variación en condiciones de repetibilidad (CVR).

**Para Precisión Intermedia:** Procesar cada material de control por quintuplicado durante cinco días. A partir de estos resultados calcular el coeficiente de variación en condiciones de repetibilidad (CVWL).

Para mejorar el rigor en la estimación, el protocolo se puede extender unos días adicionales para una o más muestras (hasta 7 días), nunca menos de 5 días. Los días de corrida no necesariamente tienen que ser consecutivos, el procesamiento debe ser en lo posible por diferentes operadores entre los días (condiciones de rutina) y examinar los datos aberrantes diariamente para detectar valores atípicos. Si se observan múltiples valores aberrantes (más de dos), considerar repetir el estudio o en su defecto contactarse con el proveedor o con el fabricante.

### 7.1.2 Criterios de Aceptabilidad:

#### Validación

El laboratorio debe tomar como referencia recomendaciones de publicaciones nacionales o internacionales dadas por los fabricantes o por instituciones reconocidas según el uso previsto del análisis clínico.

<b>CV<sub>R</sub></b> (Laboratorio)	≤	<b>CV</b> (Fabricante o instituciones reconocidas)	Aceptada
<b>CV<sub>WL</sub></b> (Laboratorio)	≤	<b>CV</b> (Fabricante o instituciones reconocidas)	Aceptada
<b>CV<sub>R</sub></b> (Laboratorio)	>	<b>CV</b> (Fabricante o instituciones reconocidas)	Rechazada
<b>CV<sub>WL</sub></b> (Laboratorio)	>	<b>CV</b> (Fabricante o instituciones reconocidas)	Rechazada

#### Verificación

El laboratorio debe verificar que el procedimiento de análisis utilizado puede obtener un desempeño semejante al declarado por el fabricante en el inserto del análisis en estudio. Lo primero es comparar el coeficiente de variación (para repetibilidad y precisión intermedia) obtenidos a partir de los datos y compararlo con el declarado por el fabricante, ante ello pueden darse dos situaciones:

- 1.- Si el coeficiente de variación obtenido es menor o igual al declarado por el fabricante la precisión en condiciones de repetibilidad y/o precisión intermedia desde un punto de vista estadístico.

<b>CV<sub>R</sub></b> (Laboratorio)	≤	<b>CV<sub>R</sub></b> (Fabricante)	Aceptada
<b>CV<sub>WL</sub></b> (Laboratorio)	≤	<b>CV<sub>R</sub></b> (Fabricante)	Aceptada

- 2.- Si el valor obtenido inicialmente supera al declarado por el fabricante: La verificación ha sido rechazada desde un punto de vista estadístico.

<b>CV<sub>R</sub></b> (Laboratorio)	>	<b>CV<sub>R</sub></b> (Fabricante)	Rechazada
<b>CV<sub>WL</sub></b> (Laboratorio)	>	<b>CV<sub>R</sub></b> (Fabricante)	Rechazada

- Según lo declarado por la guía del CLSI EP15-A3, menciona que se procede a comparar el coeficiente de variación con el límite superior de verificación (LSV) de la especificación de desempeño declarada por el fabricante. Si luego de ello el valor es menor o igual LSV se ha verificado la precisión en condiciones de repetibilidad y/o precisión intermedia desde un punto de vista estadístico, pero si el valor resulta ser superior al LSV de la especificación de desempeño declarada por el fabricante, la verificación ha sido rechazada desde un punto de vista estadístico.

**Nota1:** Para el cálculo del límite superior de verificación (LSV) en condiciones de repetibilidad y/o precisión intermedia, se utiliza la prueba F la cual se obtiene a partir de tablas y depende de los grados de libertad y de la cantidad de muestras. Este factor F es multiplicado por la especificación del fabricante para repetibilidad y/o precisión intermedia obteniendo el LSV.

<b>CV<sub>R</sub></b> (Laboratorio) $\leq$	<b>LSV</b> (Fabricante)	Aceptada
<b>CV<sub>WL</sub></b> (Laboratorio) $\leq$	<b>LSV</b> (Fabricante)	Aceptada
<b>CV<sub>R</sub></b> (Laboratorio) $>$	<b>LSV</b> (Fabricante)	Rechazada
<b>CV<sub>WL</sub></b> (Laboratorio) $>$	<b>LSV</b> (Fabricante)	Rechazada

Para el caso de algunas pruebas cualitativas sensoriales la precisión se evalúa según lo establecido en numeral 7.3 Porcentaje de Acuerdos.

## 7.2 SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD CLÍNICA

La validación y/o verificación de la sensibilidad y especificidad clínica, se da en función a las especificaciones de desempeño declaradas por el fabricante y/o las especificaciones de calidad analítica adoptada por el laboratorio.

### Condiciones Generales para evaluar la Sensibilidad y Especificidad Clínica

El laboratorio debe evaluar la sensibilidad y especificidad clínica de un procedimiento de análisis cualitativo en función a:

- Sensibilidad Clínica: Es el porcentaje de sujetos con la condición objetivo (determinada por el criterio de exactitud diagnóstica) cuyos valores de análisis son positivos. Es decir, cuando es conocida la existencia de la enfermedad mediante muestras de pacientes confirmadas como positivos a través de un método de referencia y con diagnóstico clínico de presencia de enfermedad.
- Especificidad Clínica: Es el porcentaje de sujetos sin la condición objetivo (determinada por el criterio de exactitud diagnóstica) cuyos valores de análisis son negativos. Es decir, cuando es conocida la ausencia de la enfermedad mediante muestras de pacientes con resultados negativos y con diagnóstico clínico de presencia de enfermedad.

#### 7.2.1 Procedimiento:

❖ **Validación:**

**Sensibilidad:** En situaciones regulares debe considerarse 50 muestras con diagnóstico clínico confirmado de presencia de enfermedad. El mínimo número de muestras aceptables, empleado solamente en condiciones de emergencia, es de 30 muestras (para asegurar al menos un 88,7% de Intervalo de Confianza Inferior al 95%).

Cálculo de la sensibilidad diagnóstica =  $100 \times [VP / (VP+FN)]$

VP: Total de muestras Verdaderos Positivos

FN: Total de muestras Falsos Negativos

**Especificidad:** En situaciones regulares debe considerarse 50 muestras con diagnóstico clínico confirmado de ausencia de enfermedad. El mínimo número de muestras aceptables, empleado solamente en condiciones de emergencia, es de 30 muestras (para asegurar al menos un 88,7% de Intervalo de Confianza Inferior al 95%).

Cálculo de la especificidad diagnóstica =  $100 \times [VN / (FP+VN)]$

VN: Total de muestras Verdaderos Negativos

FP: Total de muestras Falsos Positivos

**Nota1:** Para el caso de la validación de algunas pruebas moleculares en las cuales no se dispongan con muestras confirmadas con diagnóstico clínico, podrá crearse muestras positivas añadiendo ADN/ARN de la secuencia específica del microorganismo o microorganismos inactivados (muestras artificiales).

**Nota2:** Para el caso de la validación de algunas pruebas infecciosas en las cuales por la prevalencia de dicho microorganismo sea muy complicado disponer de varias muestras con criterio de exactitud diagnóstica, podrá utilizarse el número mínimo de muestras asumidas en una condición de emergencia.

**Nota3:** Las condiciones de emergencia, se refieren a eventos inesperados que afectan el normal funcionamiento de los sistemas de salud a nivel nacional e internacional, necesitando adoptar lineamientos rápidos para contrarrestar los efectos de esta situación.

❖ **Verificación:**

**Sensibilidad:** En situaciones regulares procesar como mínimo 16 muestras con diagnóstico clínico confirmado de presencia de enfermedad (para asegurar al menos un 80,0% de Intervalo de Confianza Inferior al 95%). Para sistemas en el Punto de Atención del Cliente (POCT por sus siglas en inglés) o en situaciones de emergencia procesar como mínimo 2 muestras con diagnóstico clínico confirmado de presencia de enfermedad en duplicado en 2 días distintos por 2 operadores distintos.

Cálculo de la sensibilidad diagnóstica =  $100 \times [VP / (VP+FN)]$

VP: Total de muestras Verdaderos Positivos

FN: Total de Muestras Falsos Negativos

**Especificidad:** En situaciones regulares procesar como mínimo 16 muestras con diagnóstico clínico confirmado de ausencia de enfermedad (para asegurar al menos un 80,0% de Intervalo

de Confianza Inferior al 95%). Para sistemas en el Punto de Atención del Cliente (POCT por sus siglas en inglés) o en situaciones de emergencia procesar como mínimo 2 muestras con diagnóstico clínico confirmado de ausencia de enfermedad en duplicado en 2 días distintos por 2 operadores distintos.

Cálculo de la especificidad diagnóstica =  $100 \times [VN / (FP + VN)]$

VN: Total de muestras Verdaderos Negativos

FP: Total de muestras Falsos Positivos

**Nota 1:** Para el caso de la verificación de algunas pruebas moleculares en las cuales no se dispongan con muestras confirmadas con diagnóstico clínico, podrá crearse muestras positivas añadiendo ADN/ARN de la secuencia específica del microorganismo o microorganismos inactivados (muestras artificiales).

**Nota 2:** Dentro de las pruebas positivas se deben incluir muestras desafiantes las cuales se encuentran cercanas al límite de detección o punto de corte, asimismo para mejorar el rigor en la estimación del protocolo se recomienda realizar la verificación en varios días, nunca menos de 5 días, los días de corrida no necesariamente deban ser consecutivos y el procesamiento debe ser en lo posible por diferentes operadores entre los días bajo condiciones de rutina.

### **Prevalencia de la Condición de Interés y los Valores Predictivos**

La prevalencia se define como la frecuencia de una condición de interés expresada como porcentaje versus la población total bajo estudio.

Cálculo de la Prevalencia =  $100 \times (VP + FN) / N$

Donde

VP: Total de Verdaderos Positivos;

FN: Total de Falsos Negativos;

N: Población estudiada

La combinación de la Prevalencia con las estimaciones de sensibilidad y especificidad nos muestran dos parámetros adicionales denominadas Valores Predictivos. Esta directriz está diseñada para la evaluación de las pruebas en una población de pacientes del laboratorio clínico, de tal forma que la prevalencia de la evaluación durante el empleo típico de la prueba es similar a la prevalencia en la rutina del laboratorio.

El Valor Predictivo Positivo de una prueba es la proporción de pacientes con resultado positivo quienes tienen la condición de interés. El Valor Predictivo Negativo de una prueba es la proporción de pacientes con resultado negativo quienes no presentan la condición de interés.

Solamente en el caso que la población de estudio demuestre una prevalencia similar a la prevalencia de la enfermedad dentro de la población a la que sirve el laboratorio clínico, los valores predictivos deberían ser calculados.

Cálculo del Valor Predictivo Positivo =  $100 \times VP / (VP + FP)$

Cálculo del Valor Predictivo Negativo =  $100 \times VN / (VN + FN)$



Donde:

VP: Total de Verdaderos Positivos;

FN: Total de Falsos Negativos;

VN: Total de Verdaderos Negativos;

FP: Total de Falsos Positivos

### 7.2.2 Criterios de Aceptabilidad:

**Validación:** El laboratorio debe tomar como referencia recomendaciones de publicaciones nacionales o internacionales dadas por los fabricantes o por instituciones reconocidas.

<b>Sensibilidad</b> $\geq$	<b>Sensibilidad</b> (Fabricante o instituciones reconocidas)	Aceptada
<b>Sensibilidad</b> $<$	<b>Sensibilidad</b> (Fabricante o instituciones reconocidas)	Rechazada
<b>Especificidad</b> $\geq$	<b>Especificidad</b> (Fabricante o instituciones reconocidas)	Aceptada
<b>Especificidad</b> $<$	<b>Especificidad</b> (Fabricante o instituciones reconocidas)	Rechazada

**Verificación:** El laboratorio debe tomar como referencia el valor dado por el fabricante, considerando la especificación dada y el intervalo de confianza, según el siguiente esquema:

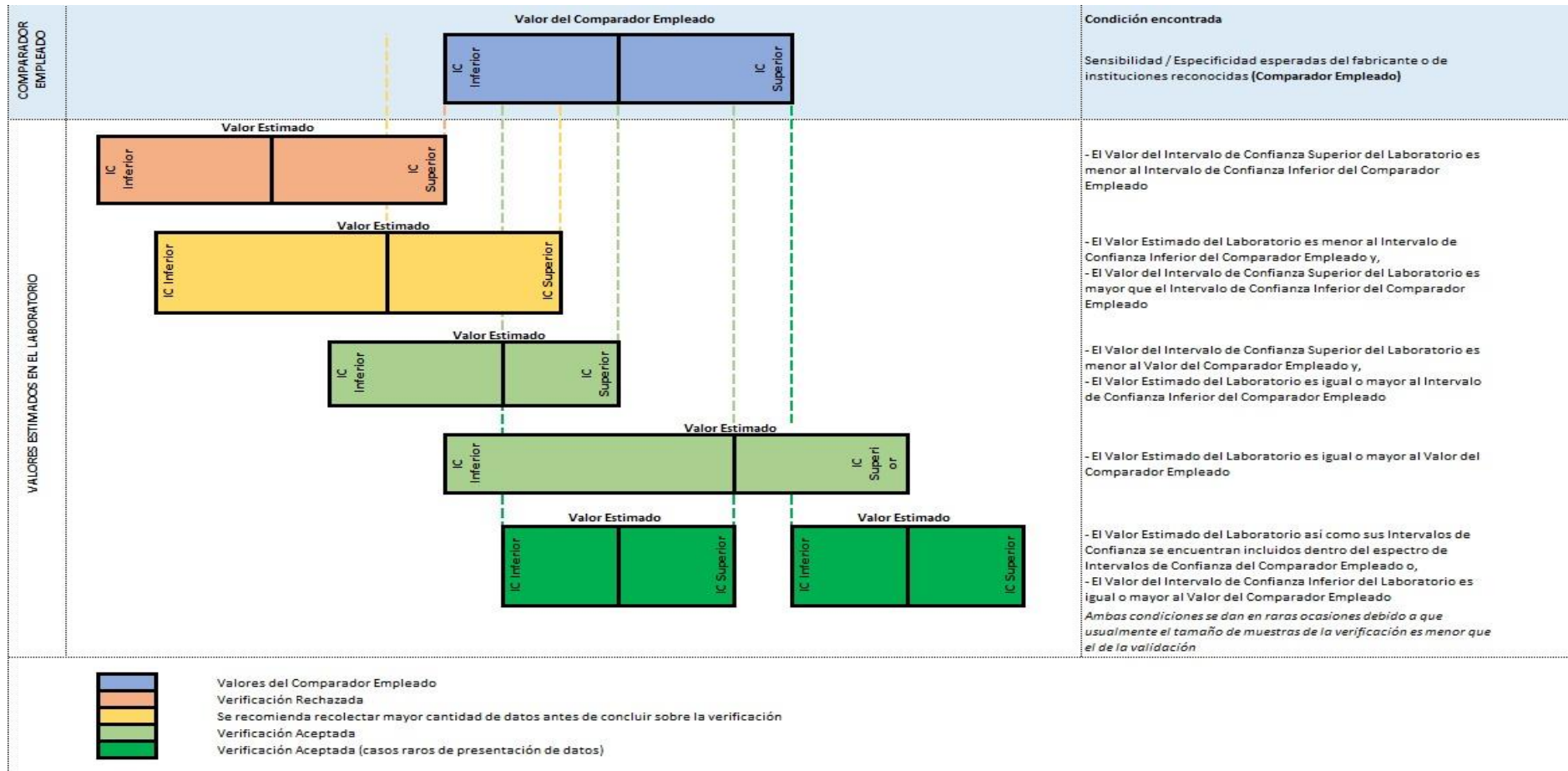


**INACAL**  
Instituto Nacional  
de Calidad  
Acreditación

## DIRECTRIZ PARA LA VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS DE ANÁLISIS CUALITATIVOS EN LOS LABORATORIOS CLÍNICOS

Código : DA-acr-24D  
Versión : 02  
Página : 18 de 58

### CRITERIOS DE ACEPTABILIDAD PARA LA VERIFICACIÓN DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNOSTICA



TODA COPIA EN PAPEL ES UN DOCUMENTO NO CONTROLADO

En caso de que el fabricante no declare el IC es responsabilidad del laboratorio hallar el intervalo de confianza para la sensibilidad y especificidad en base a las recomendaciones dadas por la guía del CLSI EP12.

1.- IC para Sensibilidad al 95% confianza:

$$\text{Límite Inferior del IC} = (100 \times \frac{A - B}{C})$$

$$\text{Límite Superior del IC} = (100 \times \frac{A + B}{C})$$

Donde: VP: Total de Verdaderos Positivos; FN: Total de Falsos Negativos

$$A = 2 \times VP + 3.84$$

$$B = 1.96 \times \sqrt{3.84 + 4 \times \frac{VP \times FN}{(VP + FN)}}$$

$$C = 2 \times (VP + FN) + 7.68$$

2.- IC para Especificidad al 95% confianza:

$$\text{Límite Inferior del IC} = (100 \times \frac{D - E}{F})$$

$$\text{Límite Superior del IC} = (100 \times \frac{D + E}{F})$$

Donde: VN: Total de Verdaderos Negativos; FP: Total de Falsos Positivos

$$D = 2 \times VN + 3.84$$

$$E = 1.96 \times \sqrt{3.84 + 4 \times \frac{VN \times FP}{(VN + FP)}}$$

$$F = 2 \times (VN + FP) + 7.68$$

### 7.3 PORCENTAJE DE ACUERDOS POSITIVOS Y NEGATIVOS:

Los acuerdos corresponden a la probabilidad de encontrar el mismo resultado en dos muestras idénticas analizadas en el mismo laboratorio, bajo condiciones de repetibilidad o comparación de un procedimiento analítico con otro.

Si el comparador no cumple con criterio de exactitud diagnóstica, se puede estimar:

- El porcentaje de Acuerdos Positivos: % de los casos en que hay acuerdo cuando el método de referencia da positivo.
- Porcentaje de Acuerdos Negativos: % de los casos en que hay acuerdo cuando el método de referencia da negativo.

Para evaluar los acuerdos se recomienda construir una tabla de contingencia de 2 x 2 de acuerdo con la siguiente estructura, registrando los acuerdos y discrepancias entre los resultados obtenidos por los métodos:

(Método candidato)	METODO COMPARADOR		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	a	b	a + b
Negativo	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	n

a: Número de resultados donde ambas pruebas son positivas

b: Número de resultados donde el método candidato es positivo, pero el comparativo es negativo

c: Número de resultados donde el método candidato es negativo, pero el comparativo es positivo

d: Número de resultados donde ambos métodos son negativos.

n: Número de muestras analizadas

#### Condiciones Generales para evaluar Porcentajes de Acuerdos Positivos y Negativos:

Se recomienda que los controles utilizados sean conmutables a la matriz de las muestras según el uso previsto, se puede utilizar controles, muestras de pacientes positivos y negativos, muestras de pacientes suplementadas, otros materiales comerciales, controles de veracidad, materiales de programas de comparación interlaboratorio, paneles de seroconversión.

**Nota 1:** Para el caso de la validación de algunas pruebas moleculares en las cuales no se dispongan de muestras confirmadas con diagnóstico clínico, podrá crearse muestras positivas añadiendo ADN/ARN de la secuencia específica del microorganismo o microorganismos inactivados (muestras artificiales).

**Nota 2:** Se espera que dentro de los controles positivos se incluyan muestras desafiantes las cuales se encuentran cercanas al punto de corte, asimismo para mejorar el rigor en la estimación del protocolo se recomienda hacer en varios días, nunca menos de 5 días, los días de corrida no necesariamente deban ser consecutivos, el procesamiento debe ser en lo posible por diferentes operadores entre los días (condiciones de rutina).

### 7.3.1. Procedimiento:

#### ❖ Validación:

#### **Porcentaje de Acuerdos Positivos (PAP): Según el CLSI:**

En situaciones regulares debe considerarse 50 muestras positivas. El mínimo número de muestras aceptables, empleado solamente en condiciones de emergencia, es de 30 muestras (para asegurar al menos un 88,7% de IC inferior al 95%).

$$\text{Cálculo del Porcentaje de Acuerdos Positivos} = 100 \times [a / (a+c)]$$

#### **Porcentaje de Acuerdos Negativos (PAN): Según el CLSI:**

Idealmente deberían considerarse 50 muestras negativas. El mínimo número de muestras aceptables, empleado solamente en condiciones de emergencia, es de 30 muestras (para asegurar al menos un 88,7% de IC inferior al 95%).

$$\text{Cálculo del Porcentaje de Acuerdos Negativos} = 100 \times [d / (b+d)]$$

En caso de que el fabricante no declare el IC es responsabilidad del laboratorio hallar el intervalo de confianza para la % de Acuerdo Positivo y % de Acuerdo Negativo en base a las recomendaciones dadas por la guía del CLSI EP12.

#### 1.- IC para Sensibilidad al 95% confianza:

$$\text{Límite Inferior del IC} = (100 \times \frac{A - B}{C})$$

$$\text{Límite Superior del IC} = (100 \times \frac{A + B}{C})$$

Donde: VP: Total de Verdaderos Positivos; FN: Total de Falsos Negativos

$$A = 2 \times a + 3.84$$

$$B = 1.96 \times \sqrt{3.84} + 4 \times \frac{a \times c}{(a + c)}$$

$$C = 2 \times (a + c) + 7.68$$

#### 2.- IC para Especificidad al 95% confianza:

$$\text{Límite Inferior del IC} = (100 \times \frac{D - E}{F})$$

$$\text{Límite Superior del IC} = (100 \times \frac{D + E}{F})$$

Donde: VN: Total de Verdaderos Negativos; FP: Total de Falsos Positivos

$$D = 2 \times d + 3.84$$

$$E = 1.96 \times \sqrt{3.84 + 4 \times \frac{d \times b}{(d + b)}}$$

$$F = 2 \times (d+b) + 7.68$$

❖ **Verificación:**

**Porcentaje de Acuerdos Positivos:** En situaciones regulares procesar como mínimo 16 muestras positivas (para asegurar al menos un 80,0% de Intervalo de Confianza Inferior al 95%). Para sistemas en el Punto de Atención del Cliente (POCT por sus siglas en inglés) o en situaciones de emergencia procesar como mínimo 2 muestras positivas en duplicado en 2 días distintos por 2 operadores distintos.

$$\text{Cálculo del Porcentaje de Acuerdos Positivos} = 100 \times [a/(a+c)]$$

**Calculo del Porcentaje de Acuerdos Negativos:** En situaciones regulares procesar como mínimo 16 muestras negativas (para asegurar al menos un 80,0% de Intervalo de Confianza Inferior al 95%). Para sistemas en el Punto de Atención del Cliente (POCT por sus siglas en inglés) o en situaciones de emergencia procesar como mínimo 2 muestras negativas en duplicado en 2 días distintos por 2 operadores distintos.

$$\text{Cálculo del Porcentaje de Acuerdos Negativos} = 100 \times [d/(b+d)]$$

**Nota:** El Porcentaje de acuerdo general se define como la relación de los valores positivos y negativos versus el total de casos evaluados. Es potestad del laboratorio si considera necesario realizar el cálculo del % de acuerdo general por temas metodológicos.

$$\text{Cálculo de Porcentaje General} = [(a + d)/n] * 100$$

**7.3.2 Criterios de Aceptabilidad:**

**Validación:** El laboratorio debe tomar como referencia recomendaciones de publicaciones nacionales o internacionales dadas por los fabricantes o por instituciones reconocidas.

<b>PAP</b> $\geq$	<b>PAP</b> (Fabricante instituciones reconocidas)	o	Aceptada
<b>PAP</b> $\leq$	<b>PAP</b> (Fabricante instituciones reconocidas)	o	Rechazada
<b>PAN</b> $\geq$	<b>PAN</b> (Fabricante instituciones reconocidas)	o	Aceptada
<b>PAN</b> $\leq$	<b>PAN</b> (Fabricante instituciones reconocidas)	o	Rechazada

**Verificación:** El laboratorio debe tomar como referencia el valor dado por el fabricante, considerando la especificación dada y el intervalo de confianza, según el siguiente esquema:

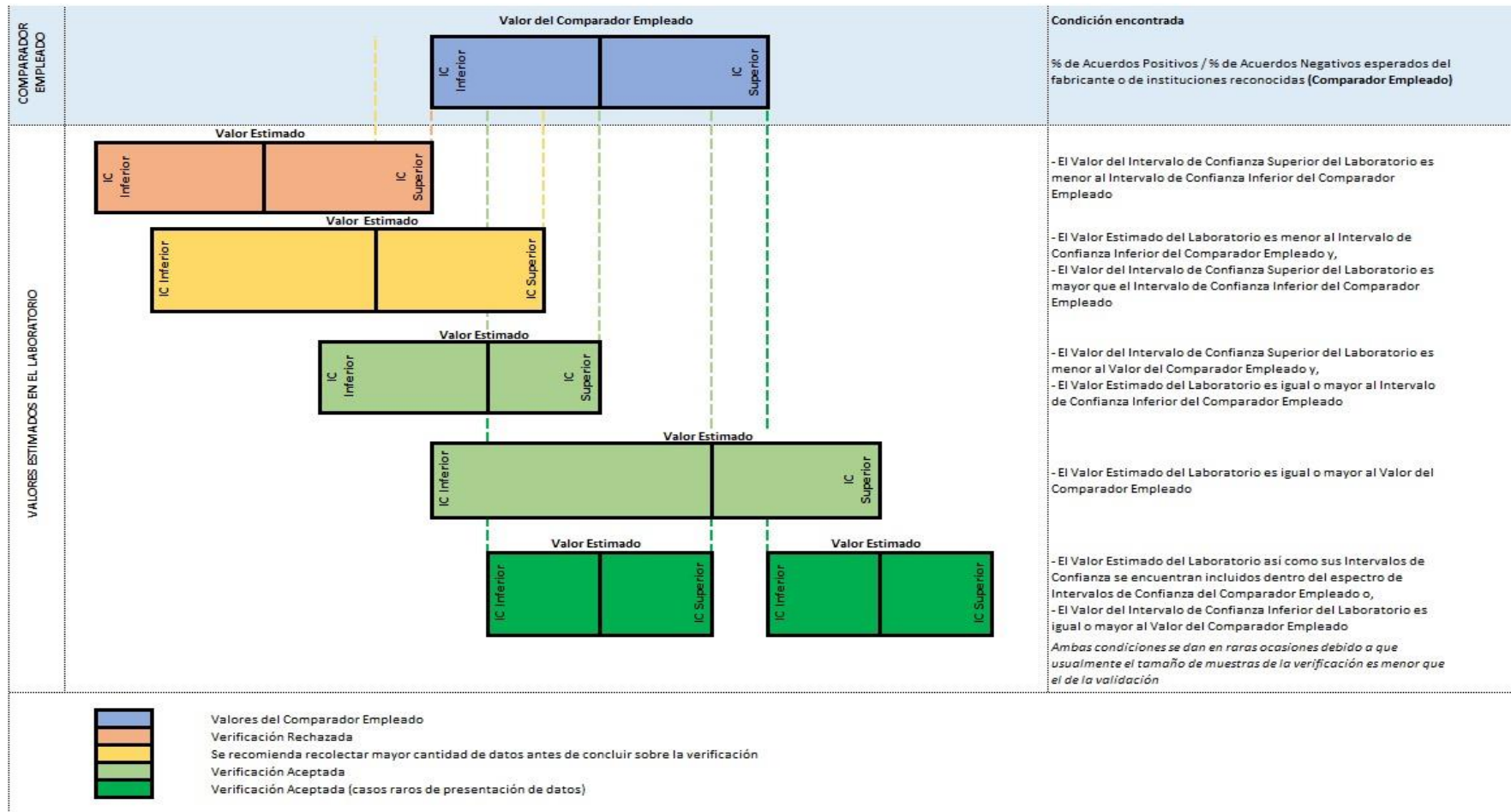


**INACAL**  
Instituto Nacional  
de Calidad  
Acreditación

## DIRECTRIZ PARA LA VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS DE ANÁLISIS CUALITATIVOS EN LOS LABORATORIOS CLÍNICOS

Código : DA-acr-24D  
Versión : 02  
Página : 23 de 58

### CRITERIOS DE ACEPTABILIDAD PARA LA VERIFICACIÓN DE PORCENTAJE DE ACUERDOS



TODA COPIA EN PAPEL ES UN DOCUMENTO NO CONTROLADO

**Nota 1:** En caso que el fabricante no declare el IC es responsabilidad del laboratorio hallar el IC para los PAP y PAN en base a las recomendaciones dadas por la guía del CLSI EP12 y descritas en el numeral 7.3.1 de esta directriz.

**Nota 2:** Se recomienda, utilizar una herramienta estadística para la interpretación de la asociación de datos, por ejemplo: Índice Kappa.

### Índice Kappa

El índice de concordancia kappa se define como la proporción de la concordancia real más allá del azar, para conocer el verdadero grado de acuerdo debido a la bondad de la prueba debe descontarse la proporción del azar.

Para realizar el análisis mediante el índice Kappa se encuentran disponibles herramientas de análisis en software estadísticos comerciales, sin embargo, a efectos de comprender la mecánica y significado de su cálculo a continuación se presentan los pasos para realizarlo de forma manual:

1.- Construir una tabla de contingencia de 2 x 2 de acuerdo con la siguiente estructura, registrando los acuerdos y discrepancias entre los resultados obtenidos por los métodos:

	METODO COMPARADOR		Total
	Positivo	Negativo	
(Método candidato)			
Positivo	a	b	r
Negativo	c	d	s
Total	t	u	n

**Donde:**

a: Número de resultados donde ambas pruebas son positivas.

b: Número de resultados donde el método candidato es positivo, pero el comparativo es negativo.

c: Número de resultados donde el método candidato es negativo, pero el comparativo es positivo

d: Número de resultados donde ambos métodos son negativos.

r: Sumatoria de los resultados obtenidos en a y b.

s: Sumatoria de los resultados obtenidos en c y d.

t: Sumatoria de los resultados obtenidos en a y c.

u: Sumatoria de los resultados obtenidos en b y d.

n: Total de muestras analizadas.

2.- Calcular el índice Kappa mediante la fórmula,

$$k = (P_o - P_e) / (1 - P_e)$$



**Donde:**

Po: la proporción de acuerdos observados.

Pe: la proporción de acuerdos esperados en la hipótesis de independencia entre los métodos, es decir de acuerdos por azar.

$$P_o = (a+d) / N$$

$$P_e = ((t * r) + (u * s)) / (n * n)$$

3.- Interpretar el índice calculado: Para la valoración se adopta la valoración propuesta por Landis y Koch de acuerdo con la siguiente escala de valoración del k:

Índice Kappa	Grado de acuerdo
< 0.00	Sin acuerdo
>0.00 - 0.20	Insignificante
0.21 - 0.40	Discreto
>0.41 - 0.60	Moderado
0.61 - 0.80	Sustancial
0.81 - 1.00	Casi perfecto

McHugh ML. Interrater reliability: the kappa statistic. Biochem Med 2012;22(3):276-82.

4.- Un valor para el índice kappa > 0,60–0,80 indica un acuerdo sustancial a casi perfecto. Es importante, a este respecto, inspeccionar el IC del 95% de kappa, ya que esto proporcionará información valiosa.

5.- Para valorar el grado de concordancia en función del índice kappa se utilizan el índice Kappa a un IC al 95%, según:

$$\text{Para un IC del 95\%; índice Kappa} \pm 1,96 \sqrt{\frac{P_o (1-P_o)}{N (1-P_e)}}$$

Po: La proporción de acuerdos observados

Pe: La proporción de acuerdos esperados

N: Total de muestras analizadas

#### 7.4. LÍMITE DE DETECCIÓN Y VALOR DE CORTE

La presencia o no de un determinado mensurando depende del nivel al que interese detectarlo. Bien puede ser al nivel del límite de detección (por ejemplo: detección del material genético de SARS-CoV-2

en muestra de hisopado nasofaríngeo) o a un nivel superior que generalmente corresponde a cierta tolerancia con un valor fijado por alguna legislación (por ejemplo: dosaje de alcohol en sangre). Estas últimas usualmente se asocian más a las mediciones cuantitativas.

La repuesta cualitativa suele ser binaria del tipo SI / NO y puede responder a distintas situaciones:

- Presencia / ausencia de un determinado mensurando en una muestra (asociado al límite de detección).
- Presencia / ausencia por encima de un determinado nivel de decisión (asociado al valor de corte).

**Límite de Detección:** Es la cantidad más baja de un mensurando en una muestra que puede ser detectada con cierto grado de probabilidad, aunque tal vez no cuantificado como un valor exacto.

En las pruebas de detección directa, esto se puede expresar como el número de copias del genoma, la dosis infecciosa, las unidades formadoras de colonias, etc. del agente que se pueden detectar y distinguir del resultado de una matriz sin el mensurando. En las pruebas de detección indirecta, es la menor cantidad de anticuerpos detectados, por lo general, la penúltima dilución de la muestra en la que el mensurando no es diferenciable de la actividad en una muestra de matriz control.

**Valor de Corte:** Es el umbral por encima del cual el resultado se reporta como positivo y por debajo del cual el resultado se informa como negativo. Este valor (normalmente en concentración) habitualmente viene fijado por alguna legislación, especificaciones del fabricante, establecidas por el laboratorio, etc. En algunas pruebas los resultados por encima del umbral son negativos y por debajo positivos. Por ejemplo, el Anti-HBc en algunas marcas de reactivos.

Los términos: Intermedio, inconcluyente, sospechoso o ambiguo, son adjetivos utilizados de forma indiferente para calificar un intervalo de valores situado entre los puntos de corte positivo y negativo.

Las pruebas cualitativas usualmente son utilizadas como pruebas de tamizaje, por ejemplo, las pruebas rápidas que detectan anticuerpos, antígenos, metabolitos como drogas de abuso, compuestos químicos, entre otros. Sólo para las muestras que tengan resultados positivos o su interpretación sea dudosa, se debería corroborar con pruebas cuantitativas siempre que estén disponibles.

### **Condiciones Generales para evaluar Límite de Detección y Valor de Corte:**

#### **Límite de detección:**

La mayor parte de las pruebas utilizadas en los laboratorios clínicos cuentan con estudios de validación por parte de los fabricantes donde se incluye información del límite de detección. En estos casos sólo es necesario realizar una verificación si la situación lo amerita. Para situaciones donde el laboratorio desarrolla o implementa una metodología y realiza modificaciones en los protocolos de trabajo, se debe validar el límite de detección.

En las pruebas cualitativas de tipo sensorial que empleen la observación directa o apoyada en la microscopia para la interpretación (por ejemplo, test de aglutinaciones o grupos sanguíneos, entre otros), no aplica validar el límite de detección.

Para Microbiología el estudio se debe realizar sobre muestras de matriz representativa con ausencia del microorganismo diana y requiere el empleo de suspensiones de inóculo con niveles de concentración bajos.

#### **Valor de corte:**

Hay situaciones donde el límite de detección y valor de corte pueden tener el mismo significado. El valor de corte es más utilizado en pruebas cuantitativas dependiente de una escala continua donde se establece un valor de decisión que es contrastado con la lectura (o concentración) de la muestra analizada para poder interpretar el resultado; es decir, si es positivo/negativo.

En los casos en que solo esté disponible la señal del instrumento y no la medición o la concentración como por ejemplo las pruebas inmunoserológicas que utilizan las técnicas de ELISA, quimioluminiscencia, entre otras, el desarrollador del ensayo debe establecer el valor de corte. Ello se establece con estudios basados en la utilización prevista de la prueba y la sensibilidad y especificidad diagnóstica esperada o deseada. Una vez que el corte se ha establecido por el fabricante, los usuarios a menudo no pueden cambiarlo; en estas situaciones sólo queda realizar una verificación.

#### **7.4.1 Procedimiento**

##### **A) Límite de Detección:**

###### **❖ Validación:**

###### **Situación general:**

Preparar muestras con concentraciones bajas del mensurando (a través de diluciones seriadas) o emplear muestras suplementadas (considerando que la matriz sea similar a las muestras de los pacientes) y cuyas concentraciones estén en el rango analítico del límite de detección esperado.

Preparar un mínimo de 5 muestras (o diluciones seriadas) con concentraciones bajas del mensurando.

A cada muestra realizar un total de 60 replicados.

###### **Para pruebas moleculares (criterios de la FDA, autorización por uso de emergencia EUA):**

Obtener un mínimo de 5 muestras con concentraciones bajas del mensurando (obtenidas mediante diluciones seriadas o pueden ser muestras suplementadas).

Se realiza un mínimo de 3 réplicas a cada muestra.

A la muestra que tenga la menor concentración positiva se realizan un total de 20 replicados.

Por ejemplo, si se establece una probabilidad del 95% de positividad. La menor concentración que tenga 19/20 resultados positivos será considerado como el límite de detección.

###### **Para Microbiología:**

Se seleccionan tantos tipos de muestras (matrices) cómo se vayan a validar.

Analizar una muestra blanco para demostrar que no tiene el microorganismo a evaluar.

Preparar 5 alícuotas de la muestra blanco. Para hemocultivo serían 5 frascos sin usar.

Las muestras deberán ser suplementadas con el material de referencia (cepas de referencia) del microorganismo a evaluar, en concentraciones progresivamente menores. La cepa de referencia del microorganismo se inocula en caldo nutritivo y se incuba en agitación durante 18 horas hasta el máximo crecimiento de su fase exponencial. Por ejemplo, partiendo de una concentración máxima de 20 UFC (hacer diluciones seriadas preferentemente a razón  $\frac{1}{2}$ , es decir, 1,  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{8}$ , etc. con agua peptonada o solución salina).

Luego inocular las diluciones a las 5 muestras blanco.

Realizar 20 replicados a cada muestra, obteniendo para cada una de ellas un valor de "negativo" o "positivo".

Paralelamente, se efectuará la titulación de los inóculos por triplicado sobre un medio general de referencia, de tal modo que se pueda conocer la concentración total de microorganismos presentes en cada alícuota de la muestra.

Se calculará el límite de detección, a la probabilidad estipulada, como el menor número de microorganismos detectados. Por ejemplo, si se establece una probabilidad del 90%, se deberá confirmar a qué concentración del microorganismo, al menos 18 de las 20 muestras analizadas, son positivas (90%).

Muestra (dilución)	R1	R2	R3	R4	R5	.....	R19	R20	Total Positivo / Negativo
Sin diluir	N	N	N	N	N	N	N	N	0 / 20
1/2	N	N	N	N	N	N	N	N	0 / 20
1/4	N	N	N	N	N	N	N	N	0 / 20
1/8	P	N	N	P	N	N	N	N	2 / 18
1/16	P	P	P	P	P	P	P	P	20 / 0

R: Resultados

P: Positivos

N: Negativos

Para este ejemplo sería la dilución 1/8; por lo tanto el límite de detección será determinada para esa dilución en UFC. El cálculo se realizará como el promedio de los recuentos obtenidos con el medio de referencia en aquella dilución en la que se han obtenido con el método a validar un número de resultados "positivos" mayor o igual a 18.

#### ❖ Verificación:

##### Situación general:

Cuando se disponga de un método cuantitativo para el mensurando a evaluar, se deberá conseguir dos muestras. Una muestra debe estar aproximadamente el 20% por encima del límite de detección declarado por el fabricante y la otra muestra el 20% por debajo.

Se realiza 20 replicados a cada muestra.

Se debe obtener para la muestra con el 20% por encima del límite de detección 19/20 resultados positivos y para la muestra con el 20% por debajo del límite de detección 19/20 resultados negativos. En ambos casos equivale al 95% de positividad o negatividad.

(Nota: El valor de  $\pm 20\%$  fue seleccionado para propósitos ilustrativos solamente. El uso previsto y la precisión aceptable de la prueba guiarán al usuario en cuanto a qué rango es útil para evaluar).

##### Pruebas moleculares y microbiología:

La verificación en ambas situaciones se puede realizar similar a los pasos de la validación pero utilizando un número mínimo de 10 replicados por muestra.

Los criterios de aceptación estarán en función a la información del límite de detección obtenido en la validación. La probabilidad obtenida sea mayor o igual a los valores obtenidos en la validación.

#### B) Valor de Corte:

##### ❖ Validación:

En los casos en que solo esté disponible la señal del instrumento y no la medición o la concentración del mensurando, como por ejemplo las pruebas inmunoserológicas que utilizan las técnicas de ELISA, quimioluminiscencia, entre otras; el fabricante del ensayo debe establecer el valor de corte. Ello se establece con estudios basados en la utilización prevista de la prueba y la sensibilidad y especificidad

diagnóstica esperada o deseada. La validación del Valor de Corte es responsabilidad de los fabricantes. Es casi infrecuente que los laboratorios clínicos lo validen.

❖ **Verificación:**

Una vez que el corte se ha establecido por el fabricante, los usuarios a menudo no pueden cambiarlo. Para que el Valor de corte no requiera un estudio de verificación, se debe asegurar que la sensibilidad y especificidad diagnóstica hayan sido evaluadas con muestras desafiantes. Caso contrario debe seguir el esquema presentado en los anexos.

**7.4.2 Criterios de Aceptabilidad:**

Para validar el límite de detección, el laboratorio debe definir sus criterios de aceptación considerando el uso previsto de la prueba. Para las verificaciones se puede tomar como referencia la información declarada por los fabricantes.

<b>Validación</b>	
Límite de Detección	Establecido por el laboratorio
Valor de Corte	Establecido por el fabricante
<b>Verificación</b>	
Límite de Detección	≥ al límite de detección del fabricante con una probabilidad del 95%
Valor de Corte	El intervalo de No fiabilidad debe incluir el Valor de Corte del fabricante

**7.5 SELECTIVIDAD (ESPECIFICIDAD ANALITICA)**

Se refiere a la capacidad del método de ensayo para detectar sólo el mensurando de interés (microorganismo, anticuerpo, secuencia genómica, drogas, u otros) y que su cuantificación no sea afectada por reactividad cruzada o la presencia de factores potencialmente interferentes en la matriz de muestra (como anticoagulantes, hemólisis, efectos de tratamientos de la muestra).

Se identifican dos aspectos relacionados a la especificidad analítica correspondientes a reactividad cruzada e interferente. La evaluación es cualitativa con estudios de interferencia donde la elección y fuentes para los tipos de muestra, organismos y secuencias reflejan el propósito y tipo de ensayo.

**Condiciones generales para evaluar la selectividad:**

El efecto del interferente en el análisis clínico, a una concentración dada causa un error sistemático constante e independiente a la concentración del mensurando de interés.

Antes de iniciar los estudios de interferencia, realizar el listado de sustancias interferentes o de reacción cruzada que potencialmente pueden afectar la prueba. En el documento CLSI EP7 A2, anexo C, se detallan concentraciones de medicamentos más comunes y algunos componentes endógenos que actúan como potenciales interferentes.

Medir el sesgo en las muestras de pacientes con interferente utilizando el análisis clínico frente al método de referencia (si es disponible y se usa de forma rutinaria en el laboratorio).

**Nota:** Dependiendo de la metodología se deben considerar los criterios para la interpretación (insertos y/o manuales del fabricante), además de reportes de organismos nacionales o internacionales, artículos publicados, bibliografía o por experiencia en el campo de aplicación.

### 7.5.1 Procedimiento

Los experimentos que se realicen deben ser en condiciones reales de ensayo. La validación es requerida para ensayos desarrollados in house, o modificados por el laboratorio a partir de la aprobación FDA/certificación CE.

#### Preparación de muestras de análisis

Para la evaluación se establece utilizar muestras reales del laboratorio, caracterizadas como:

Caracterización de muestras		Obtención
Negativa (-)	Ausencia del mensurando de interés (sólo matriz).	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Seleccionar una muestra sin el mensurando a identificar.</li> </ul>
Negativa con interferente (-i)	Ausencia del mensurando de interés, pero se añade el interferente o presencia de microorganismo, anticuerpo o secuencia de genes u otros con reactividad cruzada.	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Seleccionar muestras que no contienen al mensurando de interés, se adiciona concentración conocida del interferente*.</li> </ul>
Positiva (+)	Presencia del mensurando de interés.	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Seleccionar una muestra conteniendo al mensurando a identificar en rango de concentraciones de la prueba.</li> </ul>
Positiva con interferente (+i)	Presencia de interferente potencial, o presencia de microorganismo, anticuerpo o secuencia de genes u otros con reactividad cruzada.	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Seleccionar muestras negativas adicionada con un nivel bajo conocido del mensurando de interés y del interferente*.</li> </ul>
Material Referencia Certificado (MRC)	Adecuado para la validación.	Se dificulta hallar un material suficientemente representativo de la muestra a validar, siendo de costo elevado.

\* Una limitación de muestras suplementadas, es no tener las mismas propiedades de aquellas que se encuentran naturalmente.

Para la selectividad por identidad (cultivos microbiológicos, grupos sanguíneos, algunos estudios inmunológicos y pruebas moleculares). A pesar que no hay un mínimo de muestras recomendadas, se sugiere emplear no menos de 30 muestras (20 para verificación), siendo:

- 10 caracterizadas como Negativas (incluir -i)
- 20 caracterizadas como Positivas

Analizar cada muestra en replicados por el método de ensayo y el de referencia, elaborar la siguiente tabla con la información obtenida del experimento.

Caracterización de Muestras

Resultados	Positivo	Negativo	Total	
Método de Ensayo	Positivos	# Verdaderos Positivos (VP)	# Falsos Positivos (FP)	VP + FP
	Negativos	# Falsos Negativos (FN)	# Verdaderos Negativos (VN)	FN + VN
Total	VP + FN	FP + VN	N	

Acuerdos entre muestras y método de ensayo, sin conocer el diagnóstico.

Calcular:

$$\text{Selectividad (Especificidad Analítica)} = \frac{VN}{VN + FP} \times 100$$

**Nota 1:** Selectividad por identidad es aquella que evalúa características nominales cualitativas en los ensayos.

**Nota 2:** Para estimar los tamaños de muestras necesarios para la detección de una diferencia, se sugiere realizar el análisis de potencia.

**Nota 3:** Los estudios de interferencia emplean la concentración más alta de organismo o interferente. Si se detecta la influencia del interferente, se puede realizar una serie de muestras pareadas para determinar una concentración (si la hay) que permita la detección a pesar de la presencia del interferente.

**Nota 4:** Para validar la selectividad también se puede emplear estudios de comparación de métodos y requiere que las muestras incluyan al interferente y al mensurando de interés en los niveles de decisión médica, generalmente al límite inferior del rango reportable. El procesamiento es por duplicado que permita determinar el error sistemático (bias). (Por ejemplo aplica en pruebas de PCR multiplex).

**Nota 5:** Se puede validar la selectividad usando datos de Comparaciones interlaboratorios (validación por pares de valores): Este procedimiento es aplicable sólo cuando no es posible utilizar ninguno de los descritos anteriormente. Está basado en el uso de resultados de comparaciones interlaboratorios en los que se ha participado, y emplea estos datos como valores de referencia. La participación en estas comparaciones permite una evaluación del sesgo de manera que el laboratorio demuestre que se mantiene dentro de los criterios de aceptación definidos por normas reglamentos, por el usuario o declarado por el mismo laboratorio. (Por ejemplo aplica en algunas pruebas de microbiología).

### 7.5.2 Criterios de Aceptabilidad:

Para las validaciones de selectividad que realizan los desarrolladores del método, se considera como límites aceptables entre 75 a 90 %.

Para los laboratorios que realicen la validación de selectividad se espera un valor mayor o igual al 95%.

## ANEXO 1: Ejemplos para el desarrollo de los parámetros de validación

### SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

1.- Dentro de la pandemia de la enfermedad COVID-19 iniciada en diciembre 2019, un fabricante desea validar su metodología para detección de Anticuerpos IgM mediante ELISA obteniendo la siguiente tabla de contingencia:

	Pacientes con Enfermedad	Pacientes sin Enfermedad	TOTALES
Resultado (+)	75	0	75
Resultado (-)	10	41	51
TOTALES	85	41	126

Siendo que el valor esperado de sensibilidad y especificidad es como mínimo de 85%, indicar lo siguiente:

- Si los valores obtenidos para estos parámetros cumplen con el requerimiento establecido.
- Si la prevalencia hallada con estos números es comparable a la prevalencia de enfermedad reportada en el país de evaluación (para el ejemplo prevalencia de la enfermedad es de 22%).
- Si los Valores Predictivos Positivos y Negativos que se pueden calcular serían representativos del desempeño de la prueba.

#### Desarrollo:

a) Cálculo de la sensibilidad **clínica** =  $100 \times [VP/(VP+FN)]$

Cálculo de la sensibilidad **clínica** =  $100 \times [75/(75+10)]$

Cálculo de la sensibilidad **clínica** = **88,2%**

b) Cálculo de la especificidad **clínica** =  $100 \times [VN/(FP+VN)]$

Cálculo de la especificidad **clínica** =  $100 \times [41/(0+41)]$

Cálculo de la especificidad **clínica** = **100.0%**

c) Cálculo de la Prevalencia =  $100 \times (VP + FN) / N$

Cálculo de la Prevalencia =  $100 \times (75 + 10) / 126$

Cálculo de la Prevalencia = **67,5%**



**Interpretación de los Resultados:**

a.- La sensibilidad clínica estimada de 88,2% así como la especificidad clínica estimada de 100% superan el requerimiento mínimo establecido de 85%, por lo tanto la validación es aceptada.

Al tratarse de una condición de emergencia se acepta que el número de muestras para calcular la especificidad sea de 41.

b.- La prevalencia encontrada en las muestras analizadas es aproximadamente 3 veces superior (67,5%) a la prevalencia estimada de la enfermedad en la población del país (22%) de evaluación por lo que no son comparables. Esta situación suele presentarse cuando las muestras tomadas para evaluación son escogidas preferentemente en lugar de ser tomadas al azar de la población general.

c.- No es aconsejable reportar los valores predictivos por no ser representativos del desempeño de la prueba en la población en general reportada.

2.- Un fabricante de Equipos de Citometría de Flujo para Urianálisis declara dentro de su documentación que su metodología presenta una sensibilidad del 98% para la determinación de Leucocitos. Siendo que durante la validación se evaluaron 500 pacientes con leucocituria comprobada, ¿cuáles serían los Intervalos de Confianza al 95% debido a que estas estadísticas no están declaradas en la documentación del fabricante?

**Desarrollo:**

	Pacientes con Enfermedad	Pacientes sin Enfermedad	TOTALES
Resultado (+)	500 x 98%	N.D.	N.D.
Resultado (-)	500 – (500 x 98%)	N.D.	N.D.
TOTALES	500	N.D.	N.D.

	Pacientes con Enfermedad	Pacientes sin Enfermedad	TOTALES
Resultado (+)	490	N.D.	N.D.
Resultado (-)	10	N.D.	N.D.
TOTALES	500	N.D.	N.D.

a) Cálculo de la sensibilidad clínica =  $100 \times [VP/(VP+FN)]$

Cálculo de la sensibilidad clínica =  $100 \times [490/(490+10)]$

Cálculo de la sensibilidad clínica = **98,0%**

b) Cálculo de los Intervalos de Confianza Inferior y Superior de la Sensibilidad:

$$A = 2 \times VP + 3,84 = 2 \times 490 + 3,84 = 983,84$$

$$B = 1,96 \times \sqrt{3,84} + 4 \times \frac{490 \times 10}{500} = 1,96 \times \sqrt{3,84} + 4 \times 4900 / 500 = 12,86$$

$$(490 + 10)$$

$$C = 2 \times (490 + 10) + 7,68 = 2 \times (500) + 7,68 = 1007,68$$

$$\text{Límite Inferior del IC} = \left(100 \times \frac{A - B}{C}\right) = (100 \times (983,84 - 7,24)/1007,68) = \mathbf{96,36\%}$$

$$\text{Límite Superior del IC} = \left(100 \times \frac{A + B}{C}\right) = (100 \times (983,84 + 7,24)/1007,68) = \mathbf{98,91\%}$$

### Interpretación de los Resultados:

Los Intervalos de Confianza al 95% presentan un rango que abarca desde **96,36%** hasta **98,91%**.

3.- Dentro de la pandemia de la enfermedad COVID-19 iniciada en diciembre 2019, un fabricante desea validar su metodología RT-PCR con un certificado EUA (Emergency Use Authorization) de la FDA obteniendo la siguiente tabla de contingencia:

	Pacientes con Enfermedad	Pacientes sin Enfermedad	TOTALES
Resultado (+)	30	0	30
Resultado (-)	0	66	66
TOTALES	30	66	96

Siendo que los valores esperados mínimos de sensibilidad son del 95% con una especificidad del 99%, indicar lo siguiente:

- a.- Si los valores obtenidos para estos parámetros cumplen con el requerimiento establecido.
- b.- Si la prevalencia hallada con estos números es comparable a la prevalencia de enfermedad reportada en el país de evaluación (para el ejemplo prevalencia de la enfermedad es de 0,4%).
- c.- Si los Valores Predictivos Positivos y Negativos que se pueden calcular serían representativos del desempeño de la prueba.
- d.- Cuales son los Intervalos de Confianza para la Sensibilidad en una muestra pequeña como la mostrada:

### Desarrollo:

a) Cálculo de la sensibilidad clínica =  $100 \times [VP/(VP+FN)]$

Cálculo de la sensibilidad clínica =  $100 \times [30/(30+0)]$

Cálculo de la sensibilidad clínica = **100%**

b) Cálculo de la especificidad clínica =  $100 \times [VN/(FP+VN)]$

Cálculo de la especificidad clínica =  $100 \times [66/(0+66)]$

Cálculo de la especificidad clínica = **100%**

c) Cálculo de la Prevalencia =  $100 \times (VP + FN) / N$

Cálculo de la Prevalencia =  $100 \times (30 + 0) / 96$

Cálculo de la Prevalencia = **31,3%**

d) Cálculo de los Intervalos de Confianza Inferior y Superior de la Sensibilidad:

$$A = 2 \times VP + 3,84 = 2 \times 30 + 3,84 = 63,84$$

$$B = \frac{1,96 \times \sqrt{3,84 + 4 \times VP \times FN}}{(VP + FN)} = \frac{1,96 \times \sqrt{3,84 + 4 \times 0 / 30}}{30} = 3,84$$

$$C = 2 \times (VP + FN) + 7,68 = 2 \times (30 + 0) + 7,68 = 67,68$$

$$\text{Límite Inferior del IC} = \frac{100 \times A - B}{C} = \frac{100 \times (63,84 - 3,84)}{67,68} = \mathbf{88,65\%}$$

$$\text{Límite Superior del IC} = \frac{100 \times A + B}{C} = \frac{100 \times (63,84 + 3,84)}{67,68} = \mathbf{100\%}$$

#### Interpretación de los Resultados:

a.- La sensibilidad **clínica** estimada de 100% así como la especificidad **clínica** estimada de 100% superan los requerimientos mínimos establecidos (Sensibilidad esperada 95% y Especificidad 99%). Al tratarse de una condición de emergencia se acepta que los números de muestras sean como mínimo 30.

b.- La prevalencia encontrada en las muestras analizadas (31,3%) es muy superior a la prevalencia estimada de la enfermedad en la población del país de evaluación (0,4%) por lo que no son comparables. Esta situación suele presentarse cuando las muestras tomadas para evaluación son escogidas preferentemente en lugar de ser tomadas al azar de la población general.

c.- No es aconsejable reportar los valores predictivos por no ser representativos del desempeño de la prueba en la población en general reportada.

d.- Si bien la sensibilidad estimada es del 100%, debido al número pequeño de muestras analizadas, el intervalo de confianza al 95% inferior abarca un valor desde 88,65% de sensibilidad.

4.- Doscientos veinticuatro cepas fueron aisladas entre Enero y Diciembre del 2006 de 62 pacientes del Hospital de Niños Universitario de Würzburg, las cuales fueron identificadas como bacterias gram negativas no fermentadoras con base a la combinación de métodos estándar como morfología de colonias, tinción Gram, producción de pigmentos, crecimiento a 37° y 42°C en agar cetrimida, prueba de oxidasa y susceptibilidad a C390 por el sistema actual empleado así como secuenciamiento parcial del gen 16S rRNA como método de referencia. Estas cepas fueron conservadas y empleadas para evaluar una nueva versión de la tarjeta de

identificación de un fabricante de Equipos Automatizados para Identificación Bacteriana de microorganismos Gram Negativos No Fermentadores.

a.- Cuál es la sensibilidad hallada en esta nueva tarjeta si la tabla de contingencia contuvo los siguientes datos?

	Pacientes con Enfermedad	Pacientes sin Enfermedad	TOTALES
Resultado (+)	211	N.D.	N.D.
Resultado (-)	13	N.D.	N.D.
TOTALES	224	N.D.	N.D.

b.- Si la Sensibilidad Mínima esperada de forma segura es del 90%, ¿Cumplirá esta prueba con este requisito?

**Desarrollo:**

a) Cálculo de la sensibilidad clínica =  $100 \times [VP/(VP+FN)]$

Cálculo de la sensibilidad clínica =  $100 \times [211/(211+13)]$

Cálculo de la sensibilidad clínica = **94,2%**

b) Cálculo del Intervalo de Confianza Inferior de la Sensibilidad:

$$A = 2 \times VP + 3,84 = 2 \times 211 + 3,84 = 425,84$$

$$B = 1,96 \times \sqrt{3,84} + 4 \times \frac{211 \times 13}{(211 + 13)} = 1,96 \times \sqrt{3,84} + 4 \times \frac{2,743}{224} = 14,25$$

$$C = 2 \times (211 + 13) + 7,68 = 2 \times (224) + 7,68 = 455,68$$

$$\text{Límite Inferior del IC} = \frac{(100 \times A - B)}{C} = \frac{(100 \times (425,84 - 14,25))}{455,68} = \mathbf{90,32\%}$$

**Interpretación de los Resultados:**

a.- La sensibilidad clínica estimada de esta nueva tarjeta es del 92,4%.

b.- El Límite de Confianza Inferior al 95% de la nueva tarjeta es de 90,32% siendo ligeramente superior al mínimo de sensibilidad esperada de forma segura.

**LÍMITE DE DETECCIÓN**

1.- Se quiere establecer el límite de detección para el virus de la Influenza A /H1N1 pdm09 mediante la metodología RT-PCR en tiempo real para muestras provenientes del tracto respiratorio.

**Desarrollo:**

Se preparan diluciones seriadas  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  a partir del ARN extraído.

A cada muestra se realizan 20 replicados.

Se mide la absorbancia a 260 nm

Como control de calidad interno se emplea el gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) que está presente en las muestras clínicas.

Luego se interpreta los resultados obtenidos en función al Ct.

H1N1 pdm09	1	2	3	4	5	6	7	8	...	14	15	16	17	18	19	20
$10^{-1}$	21.13	21.18	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
$10^{-2}$	24.38	24.55	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
$10^{-3}$	27.10	27.32	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
$10^{-4}$	31.45	31.52	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
$10^{-5}$	35.00	34.72	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..

Se determinará el valor del Ct para cada dilución en función al software disponible.

Para este ejemplo se obtuvo un Ct = 32.

#### Interpretación:

Se identificará la dilución en la cual se puede detectar un Ct menor a 32 considerándolo como un resultado positivo.

Por lo tanto, para el virus Influenza H1N1 pdm09 el límite de detección es de  $10^{-4}$  con un valor de Ct de 32.

#### SELECTIVIDAD (ESPECIFICIDAD ANALÍTICA)

1.- Dentro de la pandemia de la enfermedad COVID-19 iniciada en diciembre 2019, un laboratorio universitario ha desarrollado una prueba por inmunocromatografía para detección de anticuerpos IgM. Se han obtenido 32 muestras con resultados positivos, 90 muestras de individuos sanos negativas a COVID y 04 muestras negativas a COVID (positivas a influenza A (2), H1N1 (1), hepatitis C (1)).

Se completa la tabla de contingencia indicada a continuación:

	Mx Positivas	Mx Negativas	Total
Resultado (+)	32	1	33
Resultado (-)	0	93	93
Total	32	94	126

#### Desarrollo:

$$\begin{aligned} \text{Especificidad Analítica (Selectividad)} &= 100 \times \left[ \frac{VN}{(FP+VN)} \right] \\ &= 100 \times \left[ \frac{93}{(1+93)} \right] \\ &= 98,9 \% \end{aligned}$$

#### Criterio de Aceptación:

La validación de la selectividad es 98,9% siendo mayor al valor objetivo (95 %), por lo cual es aceptada.

2.- En un laboratorio de investigación se valida la selectividad de la reacción en cadena de polimerasa para HTLV-1 en células mononucleares de sangre periférica (gen Tax, HTLV-1). Se obtienen 72 muestras conteniendo ADN de los virus HTLV-2 y VIH en presencia o ausencia del ADN HTLV-1, 23 y 49 respectivamente.

Se completa la tabla de contingencia indicada a continuación:

	Muestras HTLV-1		Total
	Positivas	Negativas	
<b>PCR HTLV-1 +</b>	23	0	23
<b>HTLV-1 -</b>	0	49	49
<b>Total</b>	23	49	72

**Desarrollo:**

$$\begin{aligned} \text{Selectividad} &= 100 \times [\text{VN}/(\text{FP}+\text{VN})] \\ &= 100 \times [49/(49)] \\ &= 100 \% \end{aligned}$$

**Criterio de Aceptación:**

La validación de la selectividad es 100 % siendo mayor al valor objetivo (95 %), por lo cual es aceptada.

3.- El laboratorio de un banco de sangre, evalúa la selectividad del antisuero anti A, empleando los métodos en aglutinación en columna (CAT - método comparador) y la adherencia de hemáties en fase sólida (SPRCA, en nuevo analizador automatizado). Se han procesado 60 muestras en un periodo de 12 días; 30 muestras con fenotipo A+ y 30 A- (22 muestras O+ y 8 B+). Se completa la tabla de contingencia indicada a continuación:

	SPRCA		Total
	A +	A -	
<b>Método CAT A +</b>	30	0	30
<b>A -</b>	0	30	30
<b>Total</b>	30	30	60

**Desarrollo:**

$$\begin{aligned} \text{Selectividad} &= 100 \times [\text{VN}/(\text{FP}+\text{VN})] \\ &= 100 \times [30/(30)] \\ &= 100 \% \end{aligned}$$

**Criterio de Aceptación:**

La validación de la selectividad es 100 % siendo mayor al valor objetivo (95 %), por lo cual es aceptada.

## ANEXO 2: Ejemplos para el desarrollo de los parámetros de verificación

### PRECISIÓN

1.- Vamos a determinar la precisión para el procedimiento de análisis de HIV cuyo punto de corte es de 1.0, para ello utilizaremos un nivel de control Anti HIV-1 (Ejemplo: control interno), por lo cual necesitamos realizar 20 determinaciones del material de control en una corrida analítica (24 horas) para la repetibilidad y 20 determinaciones del material de control en 20 días diferentes para la precisión intermedia.

#### 1.1 Para Repetibilidad: Determinaciones de Anti HIV-1 en sólo día (24 horas)

N° de corridas	Anti HIV-1 en AU/ml	N° de corridas	Anti-HIV -1 en AU/ml
1	5,01	11	4,86
2	4,75	12	4,82
3	4,91	13	4,99
4	4,85	14	5,17
5	5,02	15	4,41
6	5,0	16	4,36
7	4,80	17	4,88
8	4,90	18	4,51
9	4,81	19	4,79
10	4,95	20	4,72

#### 1.2 Para precisión Intermedia: Determinaciones de Anti-HIV en 20 días diferentes:

N° de Días	Anti HIV-1 en AU/ml	N° de Días	Anti HIV-1 en AU/ml
1	5,12	11	4,80
2	4,65	12	4,45
3	5,33	13	4,50
4	4,73	14	4,90
5	4,63	15	4,75
6	4,52	16	5,20
7	4,80	17	4,70
8	4,90	18	4,85
9	5,10	19	4,95
10	4,90	20	4,66

#### Desarrollo:

a.- De los datos obtenidos tanto para repetibilidad como precisión intermedia, vamos a calcular la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación para luego compararlo con los criterios de aceptabilidad.

**Para Repetibilidad:**

Media ( $\bar{x}$ )	4,82
Desviación Estándar (DS)	0,19
Coefficiente de Variación (CV)	4,11

**Para Precisión Intermedia:**

Media ( $\bar{x}$ )	4,80
Desviación Estándar (DS)	0,21
Coefficiente de Variación (CV)	4,55

b.- Identificar las especificaciones de desempeño para precisión que son declaradas por el fabricante y que se encuentran en el inserto del reactivo de análisis, siempre que sea posible.

Ejemplo: Se muestra las siguientes tablas contenidas en el inserto del proveedor XYZ

<b>Precisión Repetibilidad ( Intra-ensayo)</b>			
<b>Control</b>	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>CV%</b>
Anti HIV- 1	3,013 AU/ml	+/- 0,165 AU/ml	5,49
Anti HIV - 1	49,18 AU/ml	+/- 1,816 AU/ml	3,69

<b>Precisión Intermedia ( Inter-ensayo)</b>			
<b>Control</b>	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>CV%</b>
Anti HIV- 1	3,109 AU/ml	+/- 0,175 AU/ml	5,61
Anti HIV - 1	49,660 AU/ml	+/- 2,151 AU/ml	4,33

**Nota:** Tener en consideración que el valor de CV% seleccionado de los controles debe tener una matriz y concentración lo más parecido a las nuestras evaluadas.

**Interpretación:**

Comparar los resultados de CV<sub>R</sub> y CV<sub>WL</sub> obtenidos durante el protocolo contra las especificaciones del fabricante.

<b>Control</b>	<b>CV<sub>R</sub> (calculado)</b>	<b>CV% repetibilidad (fabricante)</b>	<b>Condición</b>
Nivel 2	4,11	5,49	<b>Verificación Aceptada</b>
<b>Control</b>	<b>CV<sub>WL</sub> (calculado)</b>	<b>CV % precisión Intermedia (fabricante)</b>	<b>Condición</b>
Nivel 2	4,55	5,61	<b>Verificación Aceptada</b>

Se puede concluir que en este ejemplo la verificación de la precisión ha sido aceptada.



2.- Vamos a determinar la precisión según el modelo propuesto por CLSI EP15-A3, para el procedimiento de análisis de Anti-HIV cuyo punto de corte es de 1,0, para ello utilizaremos un nivel de control Anti HIV-1 (Ejemplo: control interno), por lo cual necesitamos 25 datos obtenidos en los 5 días de corridas analíticas que se procesaron por quintuplicado (05 réplicas diarias).

	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3	Corrida 4	Corrida 5
Repetición 1	5,12	5,22	4,70	4,36	4,95
Repetición 2	4,55	5,55	4,82	4,88	5,03
Repetición 3	4,90	4,92	4,99	4,21	4,23
Repetición 4	4,80	4,81	5,10	4,99	4,53
Repetición 5	5,42	5,15	4,21	4,70	4,12

1.- Con los resultados obtenidos vamos a identificar posibles valores atípicos (aplicar la prueba de Grubbs).

- Lo primero es obtener la media y la desviación estándar a partir de la totalidad de los datos (25).

$$\text{Media } (x) = 4,81 \text{ y Desviación Estándar } (DS) = 0,37$$

- Tener en consideración que el valor del Factor G para 25 datos es de 3,135.

**Factores (G) de Grubbs críticos y Número Normal de Resultados por Prueba (n<sub>0</sub>) como una Función del Numero Totales de Resultados , N, de cinco a siete pruebas, cinco réplicas por prueba, hasta dos resultados faltantes**

Pruebas 5			Pruebas 6			Pruebas 7		
N	G	n <sub>0</sub>	N	G	n <sub>0</sub>	N	G	n <sub>0</sub>
23	3,087	4,565	28	3,199	4,643	33	3,286	4,697
24	3,112	4,792	29	3,218	4,828	34	3,301	4,853
25	3,135	5	30	3,236	5	35	3,316	5

- Procedemos a calcular los límites de Grubbs en base a la siguiente ecuación:

$$\text{Límites de Grubbs} = X + / - G \text{ crítico} * SD$$

$$\text{Límites de Grubbs} = 4,81 + / - (3,135 * 0,37) = 4,81 + / - 1,16$$

$$\text{Límite Inferior de Grubbs} = 4,80 - 1,16 = 3,65$$

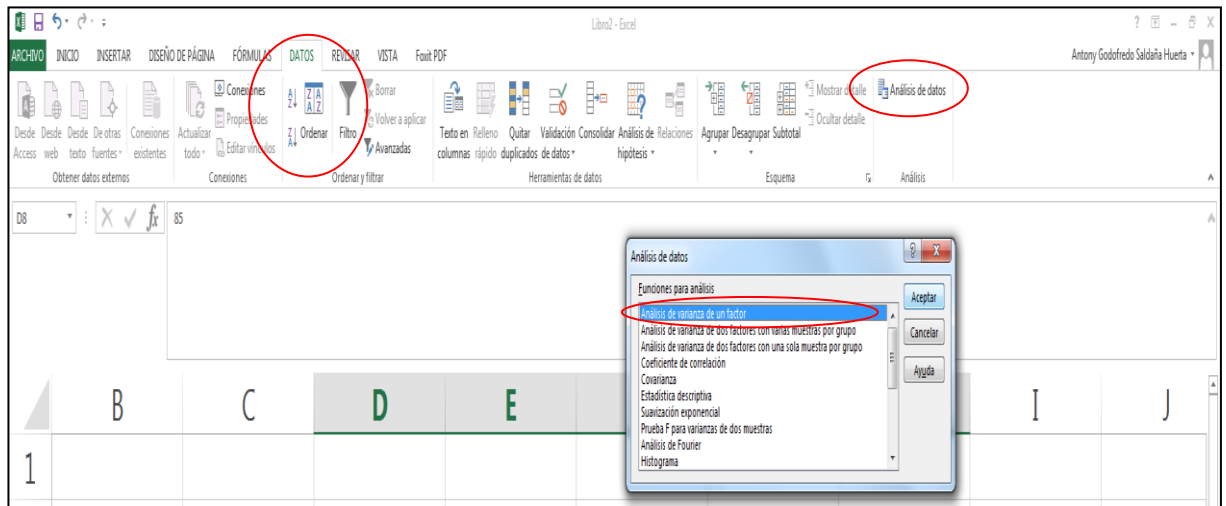
$$\text{Límite Superior de Grubbs} = 4,80 + 1,16 = 5,96$$

- Por último, verificamos que el valor más bajo y el más alto obtenido dentro de los 25 datos no superen los límites hallados. De encontrar algún dato fuera de los límites este debe ser excluido de los análisis estadísticos. (sólo se aceptarán como máximo dos valores excluidos de haber más se debe proceder a repetir todo el protocolo).

	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3	Corrida 4	Corrida 5
Repetición 1	5,12	5,22	4,70	4,36	4,95
Repetición 2	4,55	5,55	4,82	4,88	5,03
Repetición 3	4,90	4,92	4,99	4,21	4,23
Repetición 4	4,80	4,81	5,10	4,99	4,53
Repetición 5	5,42	5,15	4,21	4,70	4,12

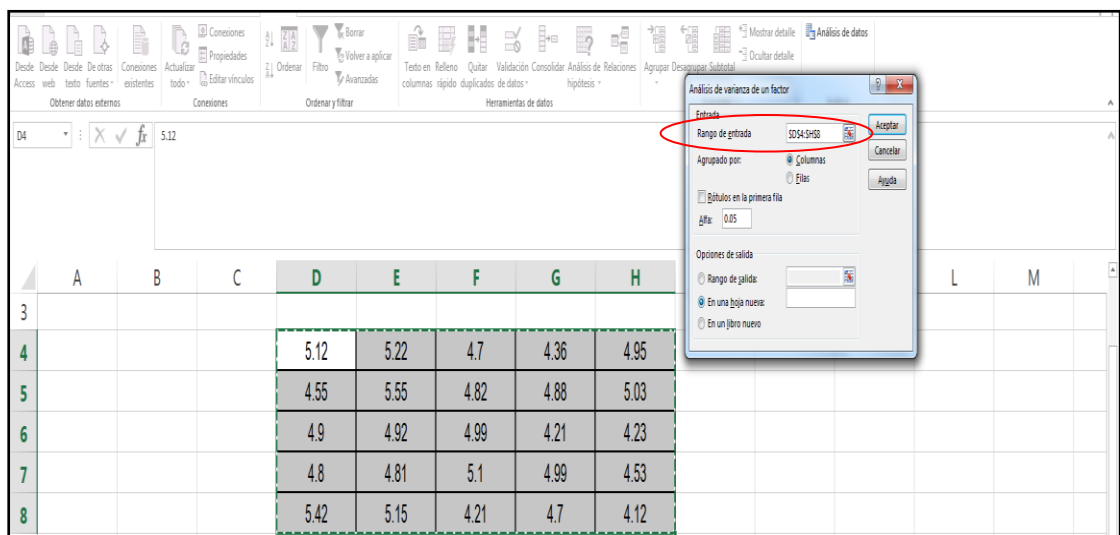
2.- Realizar los cálculos para obtener el Coeficiente de variación en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia para ello vamos a aplicar la prueba de ANOVA de un factor y efectuar los cálculos:

- a) Vamos a hacer uso del Excel para ello vamos a la pestaña de DATOS – Análisis de datos y seleccionamos la opción Análisis de Varianza de un Factor.



\*Nota: En algunos casos es necesario activar previamente la opción Análisis de Datos, para ello vamos a la pestaña de Archivo – Opciones – Complementos – Administrar complementos de Excel y activar la opción de herramientas para análisis.

- b) Seleccionamos en rango de entrada los 25 datos obtenidos, agrupado por columnas y con un valor Alfa de 0,05 (95 % de confianza).



c) Del análisis de ANOVA obtenemos los siguientes datos:

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1.080936	4	0.270234	2.284349693	0.096021721	2.866081402
Dentro de los grupos	2.36596	20	0.118298			
Total	3.446896	24				

Entre grupos = Entre corridas

Dentro de los grupos = Intra corridas

Promedio de Cuadrados entre grupos = MS1

Promedio de Cuadrados dentro de los grupos = MS2

n° = Días de corrida

d) Con estos datos vamos a calcular las varianzas:

- Varianza Intracorrida ( $V_W$ ) = MS1 = 0.11

- Varianza Entre corridas ( $V_B$ ) =  $\frac{MS1 - MS2}{n^\circ} = \frac{0.27 - 0.11}{5} = 0,032$

e) Calcular los Desvío estándar:

- Desvío estándar en condiciones de repetibilidad ( $S_R$ ) =  $\sqrt{V_W}$

$$S_R = \sqrt{0,11} = 0,33$$

- Desvío estándar en condiciones de precisión Intermedia ( $S_{WL}$ ) =  $\sqrt{V_W + V_B}$

$$S_{WL} = \sqrt{0,11 + 0,032} = 0,37$$

f) Calcular los coeficiente de variación:

- Coeficiente de variación en condiciones de repetibilidad ( $CV_R$ ) =  $\frac{S_R}{\bar{X}} \times 100$

$$CV_R = \frac{0,33}{4,81} \times 100 = 6,86$$

- Coeficiente de variación en condiciones de precisión Intermedia ( $CV_{WL}$ ) =  $\frac{S_{WL}}{X} \times 100$

$$CV_{WL} = \frac{0,37}{4,81} \times 100 = 7,69$$

3.- Identificar las especificaciones de desempeño para precisión que son declaradas por el fabricante y que se encuentran en el inserto del reactivo de análisis, siempre que sea posible.

a) Ejemplo: Se muestra las siguientes tablas contenidas en el inserto del proveedor XYZ

Precisión Repetibilidad ( Intra-ensayo)			
Control	Media	SD	CV%
Anti HIV- 1	3,013 AU/ml	+/- 0,165 AU/ml	5,49
Anti HIV - 1	49,18 AU/ml	+/- 1,816 AU/ml	3,69

Precisión Intermedia ( Inter-ensayo)			
Control	Media	SD	CV%
Anti HIV- 1	3,109 AU/ml	+/- 0,175 AU/ml	5,61
Anti HIV - 1	49,660 AU/ml	+/- 2,151 AU/ml	4,33

**Nota:** Tener en consideración que el valor de CV% seleccionado de los controles debe tener una matriz y concentración lo más parecido a las nuestras evaluadas.

4.- Comparar los resultados de  $CV_R$  y  $CV_{WL}$  obtenidos durante el protocolo contra las especificaciones del Fabricante.

Control	$CV_R$ (calculado)	CV% repetibilidad (fabricante)	Condición
Nivel 1	6,86	5,49	<b>Verificación Rechazada</b>
Control	$CV_{WL}$ (calculado)	CV % precisión Intermedia (fabricante)	Condición
Nivel 1	7,69	5,61	<b>Verificación Rechazada</b>

5.- Se procede a calcular los valores superiores de verificación (UVL) para las especificaciones de desempeño declaradas por el fabricante que fueron menores al valor obtenido por el laboratorio.

**Para Repetibilidad:**

$$\text{UVL repetibilidad} = F * CV_{RF}$$

**F:** Se toma de tablas y depende de los grados de libertad y de la cantidad de muestras.

**D<sub>fR</sub>:** Grados de libertad.

**CV<sub>RF</sub>:** Especificación del fabricante para repetibilidad

a) Determinar los grados de libertad para repetibilidad (D<sub>fR</sub>) : N - K

**N:** Cantidad de resultados.

**K:** Cantidad de corridas analíticas

$$D_{fR} = 25 - 5 = 20$$

b) Determinar el factor F a partir de la siguiente tabla proporcionada en la guía del CLSI, para el ejemplo tomamos los grados de libertad calculado para dos niveles de control.

Grados de libertad (D<sub>fR</sub>) = 20

Número de Controles = 2

Valor F = 1.31

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

DF	Number of Samples		
	1	2	3
5	1.49	1.6	1.66
6	1.45	1.55	1.61
7	1.42	1.51	1.56
8	1.39	1.48	1.53
9	1.37	1.45	1.5
10	1.35	1.43	1.47
11	1.34	1.41	1.45
12	1.32	1.39	1.43
13	1.31	1.38	1.42
14	1.3	1.37	1.4
15	1.29	1.35	1.39
16	1.28	1.34	1.38
17	1.27	1.33	1.36
18	1.27	1.32	1.35
19	1.26	1.31	1.34
20	1.25	1.31	1.34
21	1.25	1.3	1.33
22	1.24	1.29	1.32

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

Number of Samples			
<i>DF</i>	1	2	3
23	1.24	1.29	1.31
24	1.23	1.28	1.31
25	1.23	1.28	1.3
26	1.22	1.27	1.3
27	1.22	1.26	1.29
28	1.22	1.26	1.28
29	1.21	1.26	1.28
30	1.21	1.25	1.27
31	1.2	1.25	1.27
32	1.2	1.24	1.27
33	1.2	1.24	1.26
34	1.2	1.24	1.26

c) Determinar el valor superior de verificación (UVL) para repetibilidad =  $F * CV_{RF}$

$$UVL = 1,31 * 5,49$$

$$UVL = 7,19$$

Para precisión Intermedia:

$$UVL \text{ precisión Intermedia} = F * CV_{WLF}$$

**F:** Se toma de tablas y depende de los grados de libertad y de la cantidad de muestras.

**Df<sub>wL</sub>:** Grados de libertad.

**CV<sub>RF</sub>:** Especificación del fabricante para repetibilidad

**CV<sub>WLF</sub>:** Especificación del fabricante para precisión intermedia.

a) Determinar los grados de libertad para precisión intermedia (Df<sub>wL</sub>): A partir de la siguiente tabla proporcionada en la guía del CLSI, para ello primero calculamos el valor P:

$$P = \frac{CV_{WLF}}{CV_{RF}} = \frac{5,61}{5,49} = 1,02$$

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

5 Runs	
$\rho$	$df_{WL}$
1.00	24
1.03	23
1.05	22
1.08	21
1.1	20
1.12	19
1.14	18
1.16	17
1.19	16
1.21	15
1.24	14
1.28	13
1.32	12
1.37	11
1.43	10
1.51	9
1.62	8
1.78	7
2.06	6
2.74	5

**DF<sub>WL</sub> = 23**

b) Determinar el factor F a partir de la siguiente tabla proporcionada en la guía del CLSI, para el ejemplo tomamos los grados de libertad calculado para dos niveles de control.

Grados de libertad (**DF<sub>WL</sub>**) = 23  
Número de Controles = 2  
Valor F = 1,29

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

DF	Number of Samples		
	1	2	3
5	1.49	1.6	1.66
6	1.45	1.55	1.61
7	1.42	1.51	1.56
8	1.39	1.48	1.53
9	1.37	1.45	1.5
10	1.35	1.43	1.47
11	1.34	1.41	1.45
12	1.32	1.39	1.43

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

DF	Number of Samples		
	1	2	3
13	1.31	1.38	1.42
14	1.3	1.37	1.4
15	1.29	1.35	1.39
16	1.28	1.34	1.38
17	1.27	1.33	1.36
18	1.27	1.32	1.35
19	1.26	1.31	1.34
20	1.25	1.31	1.34
21	1.25	1.3	1.33
22	1.24	1.29	1.32
23	1.24	1.29	1.31
24	1.23	1.28	1.31
25	1.23	1.28	1.3
26	1.22	1.27	1.3
27	1.22	1.26	1.29
28	1.22	1.26	1.28
29	1.21	1.26	1.28
30	1.21	1.25	1.27
31	1.2	1.25	1.27
32	1.2	1.24	1.27
33	1.2	1.24	1.26
34	1.2	1.24	1.26

c) Determinar el valor superior de verificación (UVL) para precisión intermedia =  $F^*_{CV_{WLF}}$

$$UVL = 1,29 * 5,61 = 7,24$$

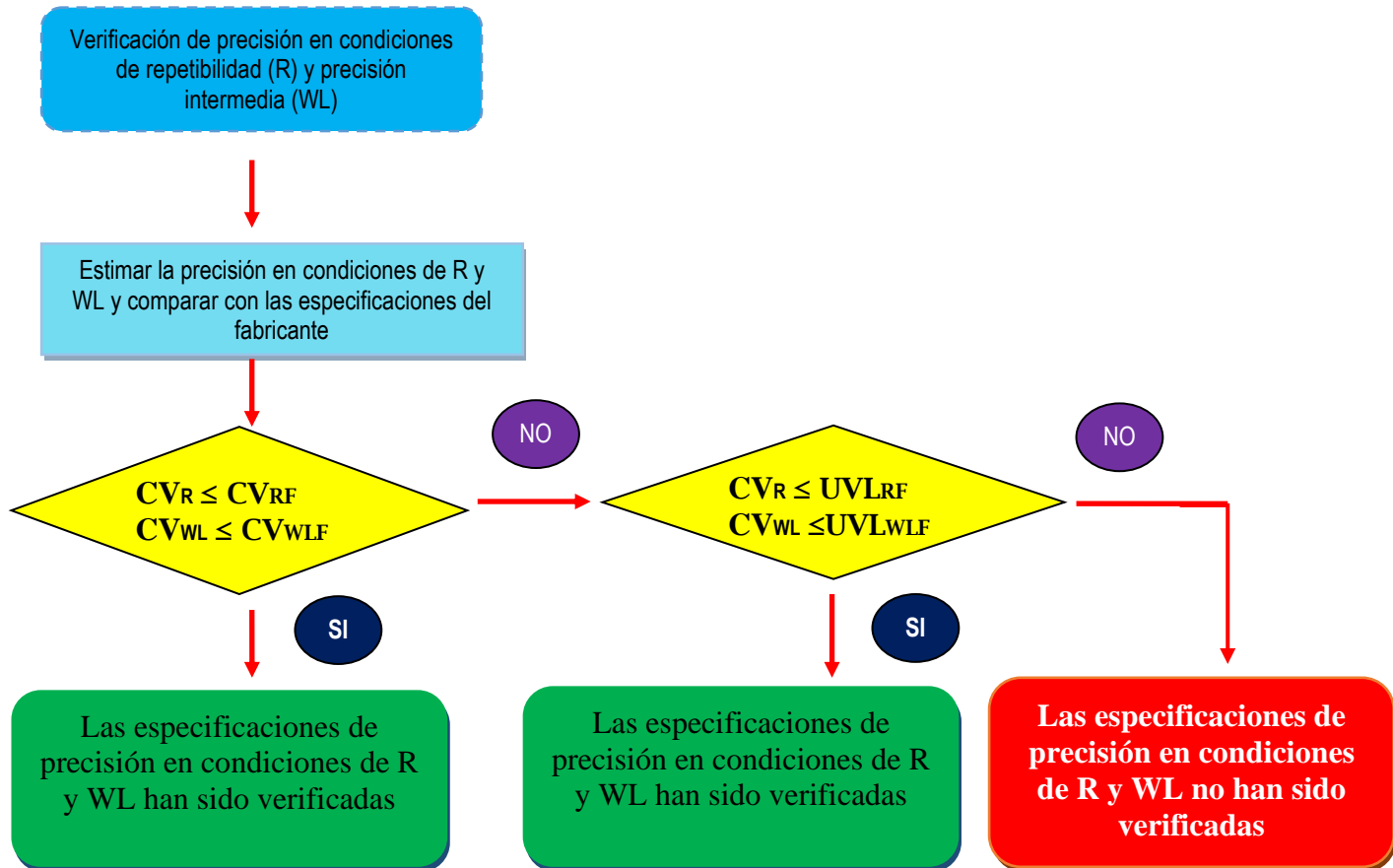
6.- Comparar los resultados de  $CV_R$  y  $CV_{WL}$  obtenidos durante el protocolo frente a los valores superiores de verificación (UVL) de las especificaciones del fabricante.

Control	CV <sub>R</sub> (calculado)	CV% repetibilidad (fabricante)	Límite Superior de Verificación (UVL) para repetibilidad	Condición
Nivel 1	6,86	5,49	7,19	Verificación Aceptada
Control	CV <sub>WL</sub> (calculado)	CV % precisión Intermedia (fabricante)	Límite Superior de Verificación (UVL) para precisión Intermedia	Condición
Nivel 1	7,69	5,61	7,24	Verificación Rechazada



Se puede concluir en este ejemplo que la verificación de la precisión ha sido aceptada en condición de repetibilidad y rechazada para precisión intermedia.

7.- Algoritmo de Interpretación de los resultados:



**SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD**

1.- Dentro de la pandemia de la enfermedad COVID-19 iniciada en diciembre 2019, un laboratorio decide trabajar con la marca validada de Anticuerpos IgM mediante ELISA, que declara Sensibilidad = 88,2% con un IC= (79,7% -93,5%) y Especificidad = 100% con un IC= (91,4% - 100%).

Para ello recolecta 20 muestras positivas (+) de pacientes diagnosticados con COVID-19 y 20 muestras negativas (-) congeladas de inicios del año 2019 obteniendo la siguiente tabla de contingencia:

	Pacientes con Enfermedad	Pacientes sin Enfermedad	TOTALES
Resultado (+)	19	1	20
Resultado (-)	1	19	20
TOTALES	20	20	40

Indicar lo siguiente:

- Cuáles son los valores de sensibilidad y especificidad encontrados por el laboratorio.
- Puede darle paso a dicho reactivo para trabajar las muestras de los pacientes.

**Desarrollo:**

a) Cálculo de la sensibilidad clínica =  $100 \times [VP/(VP+FN)]$

Cálculo de la sensibilidad clínica =  $100 \times [19/(19+1)]$

Cálculo de la sensibilidad clínica = **95%**

b) Cálculo de la especificidad clínica =  $100 \times [VN/(FP+VN)]$

Cálculo de la especificidad clínica =  $100 \times [19/(1+19)]$

Cálculo de la especificidad clínica = **95%**

c) Cálculo de los Intervalos de Confianza Inferior y Superior de la Sensibilidad:

$$A = 2 \times VP + 3,84 = 2 \times 19 + 3,84 = 41,84$$

$$B = 1,96 \times \sqrt{3,84 + 4 \times 19 \times 1} = 1,96 \times \sqrt{3,84 + 4 \times 19 / 20} = 5,42$$

(19 + 1)

$$C = 2 \times (VP + FN) + 7,68 = 2 \times (19 + 1) + 7,68 = 47,68$$

$$\text{Límite Inferior del IC} = \frac{(100 \times A - B)}{C} = \frac{(100 \times (41,84 - 5,42))}{47,68} = \mathbf{76,39\%}$$

$$\text{Límite Superior del IC} = \frac{(100 \times A + B)}{C} = \frac{(100 \times (41,84 + 5,42))}{47,68} = \mathbf{99,11\%}$$

d) Cálculo de los Intervalos de Confianza Inferior y Superior de la Especificidad:

$$D = 2 \times VN + 3,84 = 2 \times 19 + 3,84 = 41,84$$

$$E = 1,96 \times \sqrt{3,84 + 4 \times 19 \times 1} = 1,96 \times \sqrt{3,84 + 4 \times 19 / 20} = 5,42$$

(19 + 1)

$$F = 2 \times (VN + FP) + 7,68 = 2 \times (19 + 1) + 7,68 = 47,68$$

$$\text{Límite Inferior del IC} = \frac{(100 \times D - E)}{F} = \frac{(100 \times (41,84 - 5,42))}{47,68} = \mathbf{76,39\%}$$

$$\text{Límite Superior del IC} = \frac{(100 \times D + E)}{F} = \frac{(100 \times (41,84 + 5,42))}{47,68} = \mathbf{99,11\%}$$

**Interpretación de los Resultados:**

a.- Los valores de sensibilidad y especificidad clínica son del 95% cada uno.

b.- La sensibilidad clínica se encuentra por encima del valor estimado del fabricante por lo que la Verificación es aceptable.

c.- La especificidad diagnóstica 95% se encuentra por encima del Intervalo de Confianza Inferior del fabricante (IC=91,4% - 100%) por lo que la Verificación es aceptable. El procesamiento de muestras puede llevarse a cabo por el laboratorio que está verificando el método.

2.- Dentro de la pandemia de la enfermedad COVID-19 iniciada en diciembre 2019, un laboratorio decide trabajar con la marca validada Anticuerpos IgM mediante ELISA, que declara Sensibilidad = 88,2% con un IC= (79,7% -93,5%) y Especificidad = 100% con un IC= (91,4% - 100%).

Para ello recolecta 16 muestras (+) de pacientes diagnosticados con COVID-19 y 16 muestras (-) congeladas de inicios del año 2019 obteniendo la siguiente tabla de contingencia:

	Pacientes con Enfermedad	Pacientes sin Enfermedad	TOTALES
Resultado (+)	12	4	16
Resultado (-)	4	12	16
TOTALES	16	16	32

Indicar lo siguiente:

- a.- Cuáles son los valores de sensibilidad y especificidad encontrados por el laboratorio.
- b.- Puede darle paso a dicho reactivo para trabajar las muestras de los pacientes.

**Desarrollo:**

- a) Cálculo de la sensibilidad clínica =  $100 \times [VP/(VP+FN)]$

Cálculo de la sensibilidad clínica =  $100 \times [12/(12+4)]$

Cálculo de la sensibilidad clínica = **75%**

- b) Cálculo de la especificidad clínica =  $100 \times [VN/(FP+VN)]$

Cálculo de la especificidad clínica =  $100 \times [12/(4+12)]$

Cálculo de la especificidad clínica = **75%**

- c) Cálculo de los Intervalos de Confianza Inferior y Superior de la Sensibilidad:

$$A = 2 \times VP + 3,84 = 2 \times 12 + 3,84 = 27,84$$

$$B = 1,96 \times \sqrt{3,84 + 4 \times \frac{12 \times 4}{(12 + 4)}} = 1,96 \times \sqrt{3,84 + 4 \times 48 / 16} = 7,80$$

$$C = 2 \times (VP + FN) + 7,68 = 2 \times (12 + 4) + 7,68 = 39,68$$

**Límite Inferior del IC** =  $(100 \times A - B) = (100 \times (27,84 - 7,80)/39,68) = \mathbf{50,50\%}$

$$\text{Límite Superior del IC} = \frac{C}{C} (100 \times A + B) = \frac{C}{C} (100 \times (27,84 + 7,80)/39,68) = 89,82\%$$

d) Cálculo de los Intervalos de Confianza Inferior y Superior de la Especificidad:

$$D = 2 \times VN + 3,84 = 2 \times 12 + 3,84 = 27,84$$

$$E = 1,96 \times \sqrt{3,84 + 4 \times 12 \times 4} = 1,96 \times \sqrt{3,84 + 4 \times 12 / 16} = 7,80$$

$$F = 2 \times (VN + FP) + 7,68 = 2 \times (12 + 4) + 7,68 = 39,68$$

$$\text{Límite Inferior del IC} = \frac{F}{F} (100 \times D - E) = \frac{F}{F} (100 \times (27,84 - 7,80)/39,68) = 50,50\%$$

$$\text{Límite Superior del IC} = \frac{F}{F} (100 \times D + E) = \frac{F}{F} (100 \times (27,84 + 7,80)/39,68) = 89,82\%$$

#### Interpretación de los Resultados:

a.- Los valores de sensibilidad y especificidad **clínica** son del 75% cada uno.

b.- La sensibilidad **clínica** estimada (75%) se encuentra por debajo del Intervalo de Confianza Inferior del fabricante (IC=79,7% – 93,5%). Sin embargo, el Intervalo de Confianza Superior estimado de la sensibilidad **clínica** (89,82%), se encuentra por encima del Intervalo de Confianza Inferior del fabricante (79,7%), por lo que se sugeriría recolectar mayor cantidad de datos antes de concluir la verificación.

c.- La especificidad **clínica** estimada (75%) se encuentra por debajo del Intervalo de Confianza Inferior del fabricante (IC=91,4% – 100%). Asimismo, el Intervalo de Confianza Superior estimado de la especificidad **clínica** (89,82%), se encuentra también por debajo del Intervalo de Confianza Inferior del fabricante (91,4%), por lo que se rechaza la verificación de esta prueba.

Del análisis integral se concluye que la verificación es rechazada y no debería emplearse esta prueba para procesar pacientes en el laboratorio clínico.

#### PORCENTAJE DE ACUERDOS

1.- Se analizaron un total de 101 muestras en un estudio para evaluar el rendimiento de Kit de RT-PCR fluorescente para diagnóstico de COVID-19 en tiempo real en muestras de hisopado faringeo, en comparación con un test de RT-PCR previamente validado, utilizando muestras congeladas con diagnóstico clínico de COVID-19, Se obtuvieron los siguientes resultados:

Muestras de hisopado de garganta	Muestras Positivas con Enfermedad	Muestras Negativas sin Enfermedad	TOTALES
Resultado (+)	31	0	31
Resultado (-)	3	67	70
TOTALES	34	67	101

Indicar lo siguiente:

- a.- Cómo no existe un método gold estándar, aplica calcular Porcentaje de acuerdos, Cuáles son los valores de % de acuerdos General, Positivos y Negativos encontrados por el laboratorio.  
b.- Cuáles son los intervalos de confianza para el Porcentaje de acuerdos positivos y negativos.

**Desarrollo:**

- a) Cálculo de % de Acuerdo General=  $100 \times [a+d/n]$

$$\text{Cálculo del \% de Acuerdo General} = 100 \times [31+67/(101)]$$

$$\text{Cálculo del \% de Acuerdo General} = \mathbf{97\%}$$

- b) Cálculo del % de Acuerdos Positivos =  $100 \times [a/(a+c)]$

$$\text{Cálculo del \% de Acuerdos Positivos} = 100 \times [31/(31+3)]$$

$$\text{Cálculo del \% de Acuerdos Positivos} = \mathbf{91,2\%}$$

- c) Cálculo del % de Acuerdos Negativos =  $100 \times [b/(b + d)]$

$$\text{Cálculo del \% de Acuerdos Negativos} = 100 \times [67/ (67+0)]$$

$$\text{Cálculo del \% de Acuerdos Negativos} = \mathbf{100\%}$$

- d) Cálculo de los Intervalos de Confianza Inferior y Superior de los Acuerdos Positivos:

$$A = 2 \times a + 3,84 = 2 \times 31 + 3,84 = 65,84$$

$$B = 1,96 \times \sqrt{3,84 + 4 \times \frac{a \times c}{(a + c)}} = 1,96 \times \sqrt{3,84 + (4 \times 31 \times 3) / (31+3)} = 7,53$$

$$C = 2 \times (a + c) + 7,68 = 2 \times (31 + 3) + 7,68 = 75,68$$

$$\text{Límite Inferior del IC} = (100 \times \frac{A - B}{C}) = (100 \times (65,84 - 7,53) / 75,68) = \mathbf{77\%}$$

$$\text{Límite Superior del IC} = (100 \times \frac{A + B}{C}) = (100 \times (65,84 + 7,53) / 75,68) = \mathbf{97\%}$$

- e) Cálculo de los Intervalos de Confianza Inferior y Superior de los Acuerdos Negativos:

$$D = 2 \times d + 3,84 = 2 \times 67 + 3,84 = 137,84$$

$$E = 1,96 \times \sqrt{3,84 + \frac{(4 \times b \times d)}{(b + d)}} = 1,96 \times \sqrt{3,84 + (4 \times 0 \times 67) / (0 + 67)} = 3,84$$

$$F = 2 \times (d + b) + 7,68 = 2 \times (67 + 0) + 7,68 = 141,68$$

$$\text{Límite Inferior del IC} = \frac{(100 \times D - E)}{F} = \frac{(100 \times (137,84 - 3,84))}{141,68} = 94,6\%$$

$$\text{Límite Superior del IC} = \frac{(100 \times D + E)}{F} = \frac{(100 \times (137,84 + 3,84))}{141,68} = 100\%$$

**Interpretación de los Resultados:**

a.- El valor de % de Acuerdo General es del 97%, Acuerdos Positivos es del 91,2% y el % de Acuerdos Negativos es del 100%.

b.- El Intervalo de confianza de acuerdos positivos estimado es de 77% al 97% y el del Intervalo de Confianza de acuerdos negativos es de 94,6 al 100%.

2.- Se analizan un total de 54 muestras para evaluar el rendimiento de un método de ELISA para HCV a evaluar, obteniendo los siguientes resultados:

N°	Metodo Referencia	Método a evaluar	N°	Metodo Referencia	Método a evaluar	N°	Metodo Referencia	Método a evaluar
1	Reactivo	Reactivo	19	Reactivo	No reactivo	37	Reactivo	Reactivo
2	Reactivo	Reactivo	20	Reactivo	Reactivo	38	Reactivo	Reactivo
3	Reactivo	Reactivo	21	Reactivo	Reactivo	39	Reactivo	Reactivo
4	No reactivo	No reactivo	22	Reactivo	Reactivo	40	No reactivo	No reactivo
5	No reactivo	No reactivo	23	No reactivo	No reactivo	41	No reactivo	No reactivo
6	Reactivo	Reactivo	24	No reactivo	No reactivo	42	Reactivo	No reactivo
7	Reactivo	Reactivo	25	Reactivo	No reactivo	43	Reactivo	Reactivo
8	Reactivo	Reactivo	26	No reactivo	No reactivo	44	Reactivo	Reactivo
9	No reactivo	No reactivo	27	No reactivo	No reactivo	45	Reactivo	Reactivo
10	No reactivo	No reactivo	28	Reactivo	Reactivo	46	No reactivo	No reactivo
11	Reactivo	No reactivo	29	Reactivo	Reactivo	47	No reactivo	No reactivo
12	Reactivo	Reactivo	30	Reactivo	Reactivo	48	No reactivo	No reactivo
13	Reactivo	Reactivo	31	Reactivo	No reactivo	49	No reactivo	No reactivo
14	Reactivo	Reactivo	32	No reactivo	No reactivo	50	Reactivo	No reactivo
15	Reactivo	No reactivo	33	No reactivo	No reactivo	51	Reactivo	No reactivo
16	No reactivo	No reactivo	34	No reactivo	No reactivo	52	Reactivo	Reactivo
17	No reactivo	No reactivo	35	No reactivo	No reactivo	53	Reactivo	Reactivo
18	No reactivo	No reactivo	36	Reactivo	Reactivo	54	Reactivo	Reactivo

Indicar el nivel de acuerdo entre los dos (02) métodos para HCV.

**Desarrollo:**

a.- Elaborar tabla de contingencia

Método a Evaluar	Método Comparador		Total
	Reactivo	No Reactivo	
Reactivo	25(a)	0(b)	25 (r)
No reactivo	8(c)	21(d)	29 (s)
Total	33 (t)	21 (u)	54(n)

b.- Calcular el Porcentaje de Acuerdos Positivos =  $[a/(a+c)] \times 100$

$$\text{Porcentaje de acuerdos positivos} = 25/(25+8) \times 100$$

$$\text{Porcentaje de acuerdos positivos} = \mathbf{75,76\%}$$

c.- Cálculo del % de Acuerdos Negativos =  $[d/(d + b)] \times 100$

$$\text{Cálculo del \% de Acuerdos Negativos} = 21/(21+0) \times 100$$

$$\text{Cálculo del \% de Acuerdos Negativos} = \mathbf{100.0\%}$$

d.- Cálculo de los Intervalos de Confianza Inferior y Superior de los Acuerdos Positivos:

$$A = 2 \times a + 3,84 = 2 \times 25 + 3,84 = 53,84$$

$$B = 1,96 \times \sqrt{3,84 + 4 \times \frac{a \times c}{(a + c)}} = 1,96 \times \sqrt{3,84 + (25 \times 8) / (25+8)} = 10,38$$

$$C = 2 \times (a + c) + 7,68 = 2 \times (25 + 8) + 7,68 = 73,68$$

$$\text{Límite Inferior del IC} = \frac{(100 \times A - B)}{C} = \frac{(100 \times (53,84 - 10,38))}{73,68} = \mathbf{58,97\%}$$

$$\text{Límite Superior del IC} = (100 \times A + B) / C = (100 \times (53,84 + 10,38)) / 73,68 = \mathbf{87,17\%}$$

e.- Cálculo de los Intervalos de Confianza Inferior y Superior de los Acuerdos Negativos:

$$D = 2 \times d + 3,84 = 2 \times 21 + 3,84 = 45,84$$

$$E = 1,96 \times \sqrt{3,84 + (4 \times \frac{b \times d}{(b + d)})} = 1,96 \times \sqrt{3,84 + (4 \times 0 \times 21) / (0+21)} = 3,84$$

$$F = 2 \times (d + b) + 7,68 = 2 \times (21 + 0) + 7,68 = 49,68$$

$$\text{Límite Inferior del IC} = \frac{(100 \times D - E)}{F} = \frac{(100 \times (45,84 - 3,84))}{49,68} = \mathbf{84,53\%}$$

$$\text{Límite Superior del IC} = \frac{(100 \times D + E)}{F} = \frac{(100 \times (45,84 + 3,84))}{49,68} = \mathbf{100\%}$$

f.- Hallar el índice Kappa:  $k = (PO - Pe) / (1 - Pe) = (0,85 - 0,49) / (1 - 0,49) = 0,70$   
 $Po = (a+d) / n$

$$Po = (25+21)/54 = 0,85$$

$$Pe = ((t * r) + (u * s)) / (n * n)$$

$$Pe = ((33*25) + (21*29)) / (54*54) = 0,49$$

g.- Interpretar el índice kappa calculado:

Un valor de k de 0,70 indica un acuerdo sustancial.

h.- Para valorar el grado de concordancia en función del índice Kappa, calcular el intervalo de confianza al 95% del índice kappa.

$$\text{Para un IC del 95\%; índice Kappa} \pm 1,96 \sqrt{\frac{P_0(1-P_0)}{N(1-P_e)}}$$

$$\text{Límite Inferior} = k - 1,96 \times \frac{\sqrt{P_0(1-P_0)}}{N(1-P_e)} = 0,70 - 1,96 \times \frac{\sqrt{0,85(1-0,85)}}{54(1-0,49)} = 0,76$$

$$\text{Límite Superior} = k + 1,96 \times \frac{\sqrt{P_0(1-P_0)}}{N(1-P_e)} = 0,70 + 1,96 \times \frac{\sqrt{0,85(1-0,85)}}{54(1-0,49)} = 0,63$$

i.- Conclusión el índice kappa hallado indica un acuerdo sustancial.

$$k = 0,70 \text{ (IC} = 0,63 - 0,76)$$

### VALOR DE CORTE:

1.- Se quiere verificar el valor de corte para la prueba Benzodiazepinas (detección de drogas de abuso). Se obtiene una muestra de paciente con una concentración ligeramente por encima del valor de corte declarado por el fabricante (si está disponible alguna metodología, se debería medir de manera cuantitativa).

Concentración de la muestra = 0,4 mg/L

Valor de corte = 0,2 mg/L



**Desarrollo:**

Se preparan 11 tubos con diluciones proporcionales (mezclando muestra de paciente con diluyente comercial).  
A cada muestra se realizan 10 replicados (asegurar que el volumen final alcance para todas las réplicas).  
Luego se interpreta los resultados obtenidos.

Muestra preparada	Muestra de paciente (mL)	Diluyente comercial (mL)	Concentración teórica (mg/L)	Resultados Positivos/Negativos	Zona gris
C1	0,0	1,0	0,0	0/10	
C2	0,1	0,9	0,04	0/10	
C3	0,2	0,8	0,08	0/10	
C4	0,3	0,7	0,12	0/10	X
C5	0,4	0,6	0,16	1/9	
C6	0,5	0,5	0,20	7/3	
C7	0,6	0,4	0,24	9/1	
C8	0,7	0,3	0,28	10/0	X
C9	0,8	0,2	0,32	10/0	
C10	0,9	0,1	0,36	10/0	
C11	1,0	0,0	0,40	10/0	

**Resultados:**

La zona de no fiabilidad (zona gris) se inicia en la concentración más elevada para la que se obtienen todos los replicados negativos y termina en la concentración más baja en la que todos los replicados son positivos.  
Por lo tanto la zona gris está comprendida entre C4 y C8 (0,12mg/L – 0,28 mg/L).  
El valor de corte especificado por el fabricante es 0,20 mg/L.

**Interpretación**

Cómo el valor de corte establecido por el fabricante está incluido en el intervalo generado por la zona gris, la verificación ha sido aceptada.

- 2.- Se quiere verificar el valor de corte para la prueba de Thevenon (detección de sangre oculta en heces).  
Se obtiene una muestra de paciente con una concentración ligeramente por encima del valor de corte declarado por el fabricante.

Concentración de la muestra = 30 mg/L  
Valor de corte = 9 mg/L

**Desarrollo:**

Se preparan 11 tubos con diluciones proporcionales (mezclando muestra de paciente con diluyente comercial).  
A cada muestra se realizan 10 replicados (asegurar que el volumen final alcance para todas las réplicas).  
Luego se interpreta los resultados obtenidos.

Muestra preparada	Muestra de paciente (mL)	Diluyente comercial (mL)	Concentración teórica (mg/L)	Resultados Positivos/Negativos	Zona gris
C1	0,0	1,0	0	0/10	
C2	0,1	0,9	3	0/10	
C3	0,2	0,8	6	0/10	X
C4	0,3	0,7	9	2/8	
C5	0,4	0,6	12	10/0	X
C6	0,5	0,5	15	10/0	
C7	0,6	0,4	18	10/0	
C8	0,7	0,3	21	10/0	
C9	0,8	0,2	24	10/0	
C10	0,9	0,1	27	10/0	
C11	1,0	0,0	30	10/0	

**Resultados:**

La zona de no fiabilidad (zona gris) se inicia en la concentración más elevada para la que se obtienen todos los replicados negativos y termina en la concentración más baja en la que todos los replicados son positivos.

Por lo tanto, la zona gris está comprendida entre C3 y C5 (6 mg/L – 12 mg/L).

El valor de corte especificado por el fabricante es 9 mg/L.

**Interpretación:** Cómo el valor de corte establecido por el fabricante está incluido en el intervalo generado por la zona gris, la verificación ha sido aceptada.