EVALUACIÓN DE LOS CRITERIOS DE CONFIABILIDAD PARA LA DETERMINACIÓN AUTOMATIZADA DE GLUCOSA: COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE GLUCOSA OXIDASA Y HEXOQUINASA

Mejías Martínez, Marcel Jesús [1-2]; Méndez Laya, Adriana María[1-3]; Moreno, Anyella Carolina [4].
[1]Escuela de Bioanálisis, Universidad Central de Venezuela. [2] Servicio de Bioanálisis Hospital José Gregorio Hernández IVSS. [3] Servicio de Bioanálisis Maternidad "Herrera Vega" Complejo Hospitalario "Jose Ignacio Baldo". [4] Banco de Sangre de Sanitas-Venezuela.
Recibido para publicación el 2 de mayo 2014. Aprobado para publicación el 15 de mayo 2014.

RESUMEN:
La finalidad del laboratorio clínico es generar análisis oportunos, confiables y relevantes para la toma de decisiones en beneficio del paciente, por lo que los métodos empleados deben estar perfectamente validados. Uno de los analitos más sensibles para el diagnóstico de la diabetes es la glucosa, los errores asociados a su medición pueden causar graves problemas a los pacientes, de allí la importancia de conocer el desempeño de los métodos analíticos que utilizamos de rutina para su valoración. En el presente estudio se evalúan los criterios de confiabilidad que describen la ejecución analítica, en condiciones de rutina, de los métodos de "Glucosa-Oxidasa" y "Glucosa-Hexoquinasa" distribuidos por Laboratorios Heiga para el autoanalizador de química sanguínea Konelab 20, valorando su utilización para la determinación de Glicemias en el entorno clínico. La evaluación de los criterios de confiabilidad fue realizada siguiendo un protocolo diseñado en base a las recomendaciones de la CLSI, SEQC y Westgard. Se evaluaron la veracidad, precisión, linealidad e interferencias. Los resultados obtenidos para ambas metodologías se contrastaron con las especificaciones de calidad analítica (CLIA, VB y Rilibäk). Se pudo verificar que los resultados emitidos por ambas metodologías son transferibles y pueden ser utilizados indistintamente para el reporte de glicemia en el entorno clínico. Los CV% alcanzados cumplen con los requerimientos propuestos por CLIA'88 y Rilibäk, no observándose desviaciones significativas en la veracidad de los métodos que afecten su relevancia médica. Se pudo demostrar que el método de Glucosa-Oxidasa tiene un desempeño analítico general superior al método de Glucosa-Hexoquinasa.

Palabras claves: Confiabilidad analítica, evaluación del desempeño, verificación, glucosa.

EVALUATION CRITERIA FOR DETERMINING RELIABILITY AUTOMATED GLUCOSE: COMPARISON OF METHODS OF GLUCOSE OXIDASE AND HEXOKINASE

SUMMARY
The purpose of the clinical laboratory is to generate timely, reliable and relevant to decision-making in patient benefit analysis, so that the methods used must be fully validated. One of the most sensitive analytes for the diagnosis of diabetes is glucose, the errors associated with its measurement can cause serious problems for patients hence the importance of knowing the performance of the analytical methods used routinely for evaluation. In the present study the reliability criteria that describe the analytical performance is evaluated, in a routine, methods "Glucose-Oxidase" and "Glucose-Hexokinase "Laboratory Heiga distributed for blood chemistry autoanalyzer Konelab 20, evaluating its use for the determination of blood glucose in the clinical setting. Assessing reliability criteria was performed following a protocol designed based on the recommendations of the CLSI, SEQC and Westgard. The accuracy, precision, linearity and interferences were evaluated. The results for both methods were compared with analytical quality specifications (CLIA, VB and Rilibäk). It could be verified that the results issued by both methodologies are transferable and can be used interchangeably for reporting blood glucose in the clinical setting. The CV% achieved meet the requirements proposed by CLIA '88 and Rilibäk, observed no significant deviations in the accuracy of the methods that affect their medical relevance. It could be demonstrated that the glucose Oxidase method has a higher overall analytical performance of glucose-Hexokinase method.

Keywords: Analytical reliability, performance evaluation, verification, glucose.

Introducción

En la actualidad, los laboratorios de análisis clínicos ocupan un espacio de primera línea como apoyo a los servicios vinculados con la salud pública proporcionando datos valiosos que combinados con una historia clínica minuciosa y una exploración física completa, confirman un diagnóstico o proporcionan información útil sobre el estado del paciente, su evolución y su respuesta al tratamiento (1,2). La finalidad del laboratorio clínico es la de generar análisis oportunos, confiables y relevantes para la toma de decisiones en beneficio del paciente. Para ello, los datos que se informan deben ser obtenidos con técnicas analíticas precisas y adecuadas para su fin.

Los avances tecnológicos aplicados al laboratorio clínico

Solicitar copia a: Marcel Mejías. (e-mail: mejiamen@gmail.com)

en las últimas décadas han provocado el desarrollo progresivo de gran cantidad de equipos, reactivos e instrumentación analítica, que posteriormente ha sido automatizada desencadenando la mecanización creciente de la mayoría de los servicios de Bioanálisis. Esta realidad, unida a la velocidad creciente en la aparición de una gran variedad de pruebas diagnósticas, ha generado una serie de cambios en la organización que repercuten en su funcionamiento. Por todo esto, ahora más que nunca, debe existir el máximo compromiso ético y científico para la adquisición de material y tecnología de la mayor fiabilidad en base a los recursos disponibles (3). Este compromiso se traduce en la necesidad de evaluar los productos para garantizar la calidad de la instrumentación utilizada en los servicios de Bioanálisis.

La validación de las metodologías constituye un elemento fundamental en el aseguramiento de la calidad de los laboratorios clínicos (4-6). El Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), define la validación como todas las acciones destinadas a probar que un determinado proceso, sistema, equipamiento o método trabaja de la manera esperada y logra los resultados propuestos (6). Validar un método analítico consiste en verificar y documentar su validez, esto es, su adecuación a unos determinados requisitos, previamente establecidos por el usuario para poder resolver un problema particular (4).

Los requisitos establecidos por el usuario son los que definen los criterios de calidad que debe poseer un método para garantizar la utilidad clínica de los resultados. En la norma ISO 15189-2012: Laboratorios clínicos – Requisitos particulares para la calidad y la competencia se especifica que los métodos empleados por el laboratorio deben estar perfectamente validados y que toda la información referida a su desempeño analítico debe estar debidamente registrada (7). En concordancia con esta exigencia, los laboratorios clínicos deben verificar el desempeño de todos los métodos implementados. En el proceso de verificación de métodos se obtienen datos del rendimiento del sistema de medición en las condiciones de trabajo del laboratorio, ya que toma en cuenta el intervalo de concentraciones y de matrices de las muestras que rutinariamente se procesan a fin de garantizar que los resultados emitidos serán confiables y se ajustarán perfectamente a los fines clínicos para los cuales fueron destinados (8). La verificación de los métodos utilizados dentro del laboratorio clínico incluye la evaluación de los criterios de confiabilidad analítica de las metodologías en uso y contempla diversos parámetros, tales como: la veracidad, la precisión, la linealidad, y las reacciones inespecíficas del método (6, 9-13).

Además de verificar el desempeño de los métodos implementados, los laboratorios deberán validar para su uso clínico aquellos métodos desarrollados por el propio laboratorio, así como todos los procedimientos analíticos producto de la adaptación de un método disponible en la bibliografía para garantizar la calidad de sus resultados.

El objetivo final de la validación y la verificación es demostrar que el método utilizado por un laboratorio es adecuado para la aplicación en la que se propone implementar, así como también, demostrar que las modificaciones que pudieron haberse realizado no afectan su desempeño, ni la confiabilidad de los resultados por este entregado (13).

Los procedimientos en el manejo estadístico de los datos para el cálculo de estos criterios han ido evolucionando a través del tiempo (14) y son objeto de una acalorada discusión entre expertos en validación analítica a nivel mundial (15-19). La calidad analítica de los resultados se puede estimar a través de indicadores como el error aleatorio, el error sistemático y el error total (4, 6,13). Los límites de tolerancia para estos componentes de error o variación analítica han sido definidos mediante especificaciones numéricas que buscan asegurar la fiabilidad de la información sobre el estado de salud del paciente. Estas especificaciones analíticas, a cumplir para satisfacer las necesidades clínicas, se establecieron por consenso en la Conferencia Internacional de Estocolmo (4) aprobándose un modelo jerárquico con varios criterios. El primero, considera el efecto de la prestación analítica sobre cada situación clínica concreta y resulta todavía de escasa aplicación práctica y, el segundo, se basa en el efecto de las prestaciones analíticas sobre dos de las intenciones clínicas: Monitorización de pacientes individuales y diagnóstico de enfermedades con respecto a valores de referencia poblacionales. Para ambos casos se acordó que las especificaciones de calidad analítica deberían derivarse de los componentes de la "Variabilidad Biológica intra e interindividual" (19-20).

Uno de los analitos más sensibles para el diagnóstico y seguimiento de patologías como la diabetes y el síndrome metabólico es la glucosa, a la cual se le han establecido especificaciones de calidad analítica para la precisión, veracidad y error total máximo permitido (19-20). Las situaciones patológicas relacionadas con una glicemia anormal pueden ser causa de un riesgo vital y los errores

asociados a la medición han sido motivo de muerte, por lo que es esencial la caracterización de las posibles causas de error y de las medidas para evitarlas (20).

La Federación Internacional de Diabetes estimó en el año 2011 que la prevalencia ajustada de diabetes en latinoamérica era de 9.2% entre los adultos de 20 a 79 años y en Venezuela de 10,3%. De los 371 millones de adultos que viven con diabetes, 26 millones (7%) residen en nuestra región (21).

En la mayoría de los países latinoamericanos, la diabetes se encuentra entre las primeras cinco causas de mortalidad. Las causas más frecuentes de muerte entre las personas con diabetes son la cardiopatía isquémica y los accidentes cerebrovasculares. Además, la diabetes es la primera causa de ceguera, insuficiencia renal, amputaciones no debidas a traumas e incapacidad prematura y se encuentra entre las diez primeras causas de hospitalización y solicitud de atención médica (21), de allí la importancia y necesidad de contar con métodos precisos, veraces y oportunos para la determinación de Glucosa.

Los métodos para la determinación cuantitativa de glucosa se desarrollaron a partir del siglo XIX y principios del siglo XX basándose en las características reductoras de los carbohidratos (22). Las metodologías más frecuentemente utilizadas al principio del siglo pasado se desarrollaron a partir de una primera reacción de Cu^{++} a Cu^{+}, seguida por la reducción de diferentes compuestos por el Cu+ para generar productos que se medían por colorimetría, entre estos métodos se destacan los de Benedict, Folin y Wu, Nelson y Somogyi y el método de ferricianuro, los cuales han quedado en desuso por su falta de especificidad.

El desarrollo de sistemas analíticos automatizados y la necesidad de mejorar la especificidad en las determinaciones de glucosa impulsaron a la utilización de métodos enzimáticos. El método de la glucosa oxidasa fue uno de los primeros ensayos utilizados en autoanalizadores bioquímicos y continúa siendo el método de elección en muchos laboratorios clínicos por su bajo costo y facilidad de uso. En adición a este apareció el método de Hexoquinasa, el cual se basa en la fosforilación de la glucosa por la enzima Hexocinasa, formándose glucosa-6-fosfato; y en una reacción posterior catalizada por G6PD, la reducción de la coenzima NADP. La mayoría de los sistemas analíticos automatizados que actualmente se utilizan dentro del laboratorio clínico han adaptado estos dos métodos para la determinación de glucosa sérica, de allí la necesidad de evaluar los criterios de confiabilidad que describen la ejecución analítica en condiciones de rutina de estos métodos analíticos.

En el presente estudio se evalúan y comparan los criterios de confiabilidad que describen la ejecución analítica, en condiciones de rutina, de los métodos de "Glucosa Oxidasa" y "Glucosa Hexoquinasa" distribuidos por Laboratorios Heiga para el autoanalizador de química sanguínea Konelab 20 (thermo Diagnostic) valorando su utilización de forma rutinaria en la evaluación de la Glicemia en el entorno clínico.

Materiales y Métodos

La evaluación de los criterios de confiabilidad fue realizada siguiendo un protocolo diseñado en base a las recomendaciones publicadas por el CLSI (23,24) las recomendaciones de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología molecular (SEQC) (10,11,25) y los estudios realizados por el experto internacional en Control de calidad y validación de métodos, PhD James O. Westgard (26,27,30,32). Se evaluó la precisión, veracidad, linealidad y magnitudes influyentes (interferencias) en condiciones de rutina, en la determinación de glucosa sérica por los métodos de "Glucosa Oxidasa" y "Glucosa Hexoquinasa". Los resultados obtenidos para ambas metodologías se contrastaron con las especificaciones de calidad analítica (CLIA, Variabilidad Biológica y Rilibäk Richtlinie).

Para la realización de las pruebas fueron utilizadas alícuotas y/o pools de sueros remanentes provenientes de pacientes atendidos en el Servicio de Bioanálisis del Hospital José Gregorio Hernández-IVSS, Caracas-Venezuela, las cuales fueron obtenidas a partir de la centrifugación a 4000 rpm por 15 minutos de muestras de sangre total recolectadas por punción venosa en tubos sin aditivos. Siguiendo lineamientos Bioéticos dichas muestras fueron tratadas según las recomendaciones recogidas en el anexo C, aparte C.9 de la norma CONVENIN–ISO 15189:2007 Laboratorios Clínicos - Requisitos particulares para la Calidad y la competencia) referente al uso de muestras de análisis para propósitos diferentes a los solicitados (30).

EVALUACIÓN DE LA IMPRECISIÓN.

A.1. IMPRECISIÓN INTRASERIAL (Condiciones de repetibilidad)

Para el cálculo de la imprecisión intraserial, se realizaron veinte (20) mediciones consecutivas en una misma serie analítica de tres (3) niveles de material control (SeronormTM Human 1-2 y PatonormTM low),

durante tres (3) días consecutivos para ambos métodos de determinación de Glicemia (29).

A.2. IMPRECISIÓN INTERSERIAL (Condiciones de precisión intermedia)

En el cálculo de la imprecisión interserial o intermedia (reproducibilidad), se realizó la determinación de glucosa por duplicado en tres (3) niveles de material control (SeronormTM Human 1-2 y PatonormTM low) por veinte días consecutivos para cada metodología en estudio (29).

B. EVALUACIÓN DEL ERROR SISTEMÁTICO.

En el estudio de evaluación del error sistemático se determinaron aquellos componentes que pueden influir en la veracidad del método. Para ello fueron realizados estudios de linealidad, comparación de métodos, determinación de magnitudes influyentes (interferencias endógenas) y veracidad contra material de referencia (MRC).

B.1. LINEALIDAD

Para realizar la verificación de la linealidad de cada método se utilizó el protocolo EP6-A de la CLSI (6). Se preparó una mezcla con muestras de suero con elevada concentración de Glucosa (cercana a la dada por el fabricante como límite superior del rango reportable) y una con baja concentración. A partir de estas, se realizaron cuatro (4) diluciones con valores intermedios, para un total de 6 concentraciones, abarcando el rango dinámico reportado para ambos métodos; cada punto se valoró por triplicado (3,6,25,31). El orden de análisis fue aleatorio para evitar posibles efectos de arrastre. Se calculó la concentración teórica a partir de la fórmula:

$$\text{Concentración} = \frac{(C_1 V_1 + C_5 V_5)}{(V_1 + V_5)}$$

Las concentraciones empleadas incluyeron los niveles de decisión médica (45 mg/dl, 120 mg/dl y 180 mg/dl). Para realizar el análisis estadístico de los resultados se utilizó el método polinómico (b1, b2 y b3) para obtener los coeficientes bi, el error estándar de la pendiente (SE) y el resultado de la probabilidad (p 0,05) para determinar la significancia de los coeficientes de no linealidad b2 y b3. Si el valor de p es mayor a 0,05 el método se considera lineal en el intervalo estudiado.

B.2 CONCORDANCIA (Comparación de métodos)

Para la comparación de los métodos en estudio fueron analizadas alícuotas de sueros remanentes (n=121) distribuidas a lo largo del intervalo dinámico de la prueba, procesadas simultáneamente y por duplicado para ambas metodologías, las cuales fueron previamente calibradas y controladas siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Los resultados fueron analizados estadísticamente en el momento de su obtención con la finalidad de detectar valores aberrantes (criterio de Dixon y Massey). En el caso de ser detectado un valor aberrante, se reanalizaron las muestras para descartar la presencia de reacciones inespecíficas (matriz dependiente), que pudieran afectar uno o ambos métodos sesgando el valor de las diferencias encontradas (32). Esta evaluación permitió calcular el error sistemático o el sesgo existente entre el método bajo evaluación (Oxidasa) y el procedimiento analítico instaurado en el laboratorio (Hexoquinasa) (12, 26).

B.3. PRUEBA DE INTERFERENCIAS (Magnitudes influyentes)

En la evaluación de magnitudes influyentes (interferencias) se preparó un pools de suero (aproximadamente 50 ml) libre de hemólisis, lipemia o ictericia. Después de conformado el pool se cuantificó la concentración basal de glucosa (método oxidasa-peroxidasa y hexoquinasa). Para el estudio de interferencia se realizaron diluciones consecutivas de un preparado hemolizado (8 g/L) y un Standard de Bilirrubina (concentración 50 mg/dl). Se procesaron por triplicados 5 niveles de concentración del espécimen problema con interferente y 5 del espécimen control dentro de una misma serie analítica y con secuencia aleatoria (15 alícuotas en total para cada espécimen) para cada una de las magnitudes influyentes evaluadas (san-Hb y srm-Bilirrubina). Se consideró que existía interferencia estadísticamente significativa si el intervalo de confianza del valor de d, no incluía el cero

$$IC_{(99\%)} = d \pm 2{,}99 \left(\frac{2S^2}{15}\right)^{1/2}$$

Se consideró que existía interferencia analíticamente significativa si la interferencia superaba los límites de +/- 3s de la desviación estándar intraserial para la concentración estudiada, y la interferencia fue considerada clínicamente significativa si superaba el límite de la mitad del coeficiente de variación biológico intraindividual para la concentración del constituyente LICS=[(Xc.CVi/2)]/100 (12, 25, 32, 34, 35). Adicionalmente, se elaboró el Interferograma correspondientes a cada uno de los interferentes evaluados.

B.4.- VERACIDAD UTILIZANDO MATERIALES DE REFERENCIA

Para la determinación de la Veracidad se utilizó el protocolo propuesto en la norma EP15-A2 de la CLSI y las recomendaciones de la SEQC (34). Se empleó material de referencia de matriz humana con un valor asignado para la glucosa y su correspondiente valor de incertidumbre (Senonorm TM Human y Senonorm TM Human High) trazable al método de referencia ID-MS. El material fue preparado siguiendo las instrucciones del proveedor. Se realizaron mediciones por triplicado para cada metodología en 3 días consecutivos. Para cada serie se empleó un vial distinto de material control.

Se consideró que el método carecía de error sistemático si el valor absoluto era inferior o igual a su incertidumbre expandida (UES) con un valor de cobertura de 2 (k=2).

MANEJO ESTADÍSTICO

Los datos fueron introducidos en una base de datos Excel y el análisis estadístico se realizó utilizando el programa StatisPro TM versión 2.5 de la CLSI.

Resultados

EVALUACIÓN DE LA IMPRECISIÓN.

Los resultados de los coeficientes de variación intraserial e interserial de cada uno de los métodos evaluados, así como los límites de aceptabilidad para comprobar el nivel de cumplimiento con las especificaciones analíticas se muestran en la tabla 1.

El método glucosa oxidasa exhibió la mejor precisión intra e interserial alcanzando y superando las metas planteadas por CLIA´88, Rilibäk Richtlinie y las especificaciones mínimas de aceptabilidad para variabilidad biológica, con excepción a la reproducibilidad en el Nivel II (75 mg/dl) donde la glucosa oxidasa alcanzó un CV% mayor al exigido en la metas mínimas de variabilidad biológica (4,6% vs 4,28%). El método de glucosa hexoquinasa, superó las metas planteadas por CLIA´88 y Rilibäk Richtlinie, pero sólo alcanzó las metas mínimas de desempeño por variabilidad biológica en repetibilidad en los niveles II y III y en reproducibilidad en el Nivel III.

B.EVALUACIÓN DEL ERROR SISTEMÁTICO.

B.1. LINEALIDAD

En la verificación de la linealidad de la srm-glucosa, al realizar la inspección visual de los resultados obtenidos por los métodos evaluados, se pudo observar un comportamiento lineal. En la Tabla 2 se resumen los resultados correspondientes a cada una de las concentraciones ensayadas y las ecuaciones de regresión polinómica del análisis estadísticos propuesto por la CLSI, acompañados de los valores de probabilidad (p 0,05). En la figura 1 se muestran los gráficos de linealidad para ambos métodos (A y C) y las gráficas

TABLA 1. Coeficiente de Variación Intra e Interserial de los métodos Glucosa Hexoquinasa y Glucosa Oxidasa

	Imprecisión intraserial. CV(%) n=60		Imprecision interserial CV(%) n=40	
	Glucosa Hexoquinasa	Glucosa Oxidasa	Glucosa Hexoquinasa	Glucosa Oxidasa
NIVEL I (30 mg/dl)	4,3	3,0	4,5	2,7
NIVEL II (75 mg/dl)	2,7	3,4	4,3	4,6
NIVEL III (180 mg/dl)	2,8	1,9	2,5	2,3

TABLA 2. Evaluación de la Linealidad para los métodos glucosa Hexoquinasa y glucosa Oxidasa

Métodos Evaluados	b0	b1	b2 *	SE*	p*	b3*	SE*	p*
Glucosa Hexoquinasa	-0,495	1,01	0,000357	0,0003372	0,3075	-4,44.10-7	3,763.10-7	0,2576
Glucosa Oxidasa	3,24	0,993	-0,000384	0,0002565	0,1563	3,59.10-7	2,978.10-7	0,2479

Nota: * Polinomio de tercer orden

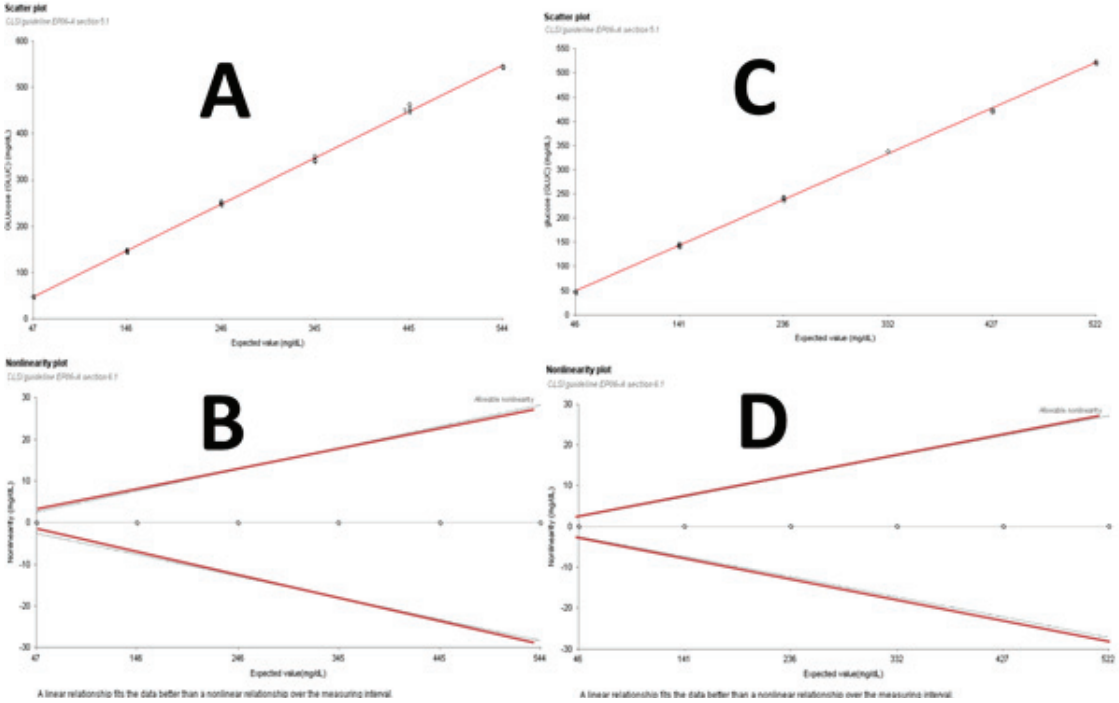


FIGURA 1. A.Gráfica de linealidad para glucosa Oxidasa. C.Gráfica de Linealidad para glucosa Hexoquinasa. B.Gráfica de NO linealidad relativa a la relevancia clínica para la glucosa Oxidasa. D.Gráfica de NO linealidad relativa a la relevancia Clínica para la glucosa Hexoquinasa.

de la No linealidad relativa a la relevancia clínica (B y D), evidenciando que ambos métodos presentan un comportamiento lineal dentro del rango evaluado y que la No linealidad presente no supera el valor de relevancia clínica establecido como el 50% del error total máximo permisible.

B.2. CONCORDANCIA (comparación de métodos)

En la figura 2 están representados los resultados de la regresión lineal de Passing Bablok, la cual reveló una pendiente de 1,01 con un intervalo de confianza de 95% que incluye a 1 (1,00 a 1,03), una ordenada en el origen de 0,53 con un intervalo de confianza que incluye a 0 (-0,97 a 2,00), r: 1,00 y un rango que va de 60 a 645 mg/dl. El análisis de Bland-Altman muestra una media de las diferencias de 1,5 mg/dl (IC95% 0,8 a 2,3) con una SD de las diferencias de 4,1 mg/dl.

Para la evaluación de los errores analíticos, en la Tabla 3 se presentan los resultados del sesgo (E%) calculado a través de la ecuación de la recta de regresión de Passing Bablok, en los diferentes niveles de decisión médica, confrontados con los requisitos de calidad analítica.

B.3. PRUEBA DE INTERFERENCIAS

Los datos obtenidos en el estudio de interferencias endógenas por san-hemoglobina y srm-Bilirrubina se resumen en las tablas 4-5. Los resultados representan el comportamiento de la valoración de glucosa por ambos métodos frente a niveles ascendentes de la magnitud influyente en estudio. Se consideró la existencia de interferencia estadística, analítica y clínicamente significativa para cada uno de los niveles del interferente. Así mismo, en las figuras 3 y 4 se muestra la

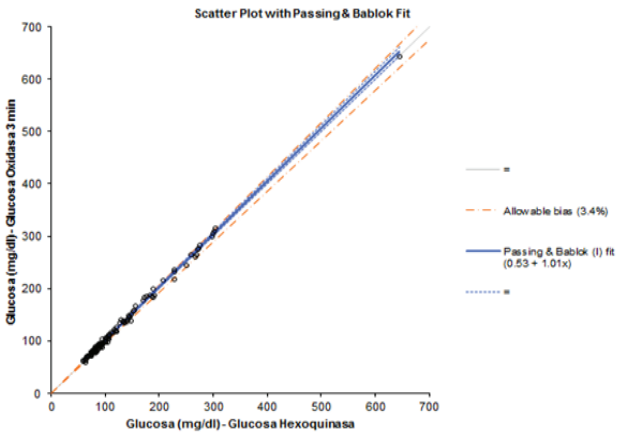


FIGURA 2. Recta de regresión Passing-Bablok de los resultados de Glucosa en suero obtenidos por los Métodos Glucosa Hexoquinasa y Glucosa Oxidasa.

TABLA 3. Sesgo entre los Métodos Evaluados con los Límites de Aceptabilidad

Nivel de decisión médica (mg/dl)	Yc	E%	CLIA* ET(%)	VB (E%)	Rilibäk Richtlinie (E%)
45	46	2,22	10	3,36	6
120	122	1,67			
180	182	1,11			

Yc: Valor de Glucosa Oxidasa calculado a través de la ecuación de regresión. *Los valores CLIA expresados en Error Total.

representación gráfica (interferograma) de las pruebas realizadas para ambos métodos.

El estudio de interferencia por hemolisis para el método de glucosa hexoquinasa indica que no existe interferencia estadística, analítica y clínica que afecte la determinación hasta un nivel de 12 g/L del interferente. El método de glucosa oxidasa muestra interferencia estadística y clínica a partir de niveles de hemólisis cercanos a los 12 g/L de Hemoglobina.

La influencia de la bilirrubina en la determinación de glicemia por el método de Glucosa Hexoquinasa fue clínicamente importante a partir de una concentración

TABLA 4. Interferencia endógena por san-Hemoglobina para los métodos Glucosa Hexoquinasa y Glucosa Oxidasa

MÉTODO	GLUCOSA HEXOQUINASA S=6,1mg/dl Xc=127mgdl				GLUCOSA OXIDASA S=4,1mg/dl Xc=127mgdl			
CONCENTRACIÓN DEL INTERFERENTE Hemoglobina (g/L)	4,8	6,0	7,4	12,0	4,8	6,0	7,4	12,0
D	0,80	0,73	0,87	1,40	0,87	1,80	2,87	6,53
IC(99%)	± 6,66	± 6,66	± 6,66	± 6,66	± 4,48	± 4,48	± 4,48	± 4,48
SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA	No Significativo	No Significativo	No Significativo	No Significativo	No Significativo	No Significativo	No Significativo	**Significativo**
SIGNIFICANCIA ANALÍTICA	No Significativo	No Significativo	No Significativo	No Significativo	No Significativo	No Significativo	No Significativo	No Significativo
SIGNIFICANCIA CLÍNICA (LICS)	LIC>3,6 No Significativo	LIC>3,6 No Significativo	LIC >3,6 No Significativo	LIC >3,6 No Significativo	LIC >3,6 No Significativo	LIC >3,6 No Significativo	LIC >3,6 No Significativo	**LIC <3,6 Significativo**

S= Desviación Estándar Intraserial Xc= Concentración del Constituyente.

$IC_{(99\%)} = d \pm 2{,}99 \left(\frac{2S^2}{15}\right)^{(1/2)}$ LICS= *[(Xc .CVi/2)]/100*

TABLA 5. Interferencia endógena por srm-Bilirrubina para los métodos Glucosa Hexoquinasa y Glucosa Oxidasa

MÉTODO	GLUCOSA HEXOQUINASA S=6,1mg/dl Xc=127mgdl				GLUCOSA OXIDASA S=4,1mg/dl Xc=127mgdl			
CONCENTRACIÓN DEL INTERFERENTE Bilirrubina (g/L)	1,5	2,0	2,5	6.8	1,5	2,0	2,5	6.8
D	3,20	3,9	6,93	17,67	3,53	4,00	4,40	13,93
IC(99%)	± 6,66	± 6,66	± 6,66	± 6,66	± 4,48	± 4,48	± 4,48	± 4,48
SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA	No Significativo	No Significativo	**Significativo**	**Significativo**	No Significativo	No Significativo	No Significativo	**Significativo**
SIGNIFICANCIA ANALÍTICA	No Significativo	No Significativo	No Significativo	No Significativo	No Significativo	No Significativo	No Significativo	**Significativo**
SIGNIFICANCIA CLÍNICA (LICS)	LIC>3,6 No Significativo	**LIC<3,6 Significativo**	**LIC <3,6 Significativo**	**LIC <3,6 Significativo**	LIC >3,6 No Significativo	**LIC <3,6 Significativo**	**LIC <3,6 Significativo**	**LIC <3,6 Significativo**

S= Desviación Estándar Intraserial Xc= Concentración del Constituyente.

$IC_{(99\%)} = d \pm 2{,}99 \left(\frac{2S^2}{15}\right)^{(1/2)}$ LICS= *[(Xc .CVi/2)]/100*

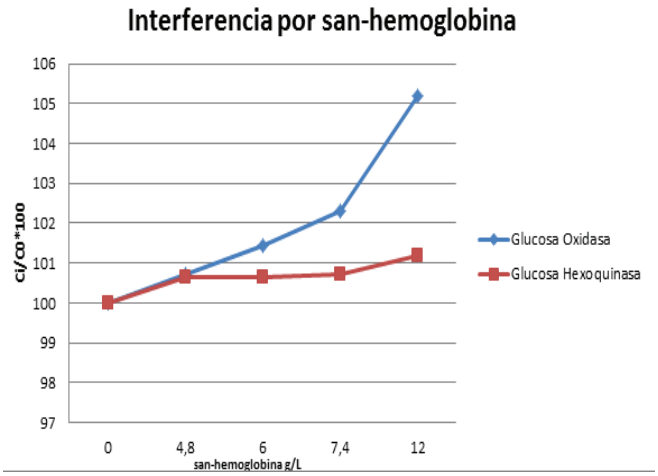


FIGURA 3. Interferograma por san-Hemoglobina para el Método Glucosa Hexoquinasa y Glucosa Oxidasa.

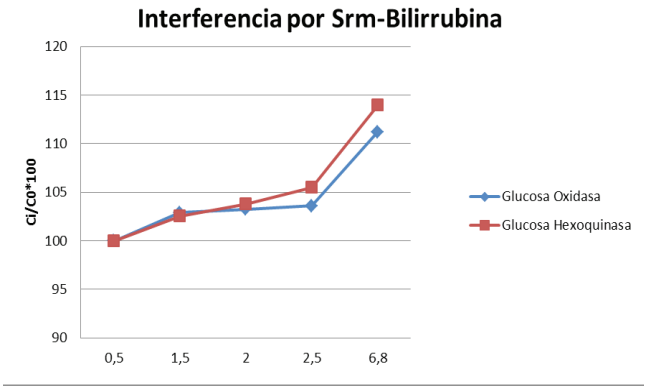


FIGURA 4. Interferograma por srm-Bilirrubina para el Método Glucosa Hexoquinasa y Glucosa Oxidasa

de 2 mg/dl de bilirrubina, a diferencia de lo observado en el método de glucosa oxidasa, en el cual la interferencia clínicamente significativa comienzan partir de 2,5 mg/dl.

B.4.- VERACIDAD UTILIZANDO MATERIALES DE REFERENCIA

Los resultados de la evaluación de la veracidad a través del uso de materiales de referencia evidencian que no existen diferencias significativas (IC 95%) entre las medias obtenidas por los métodos en estudio y la media asignada al material de referencia en cada uno de los niveles de concentración evaluados (Tabla 5).

Discusión

Dentro de los criterios utilizados en la actualidad para el diagnóstico y seguimiento de la Diabetes Mellitus, la determinación de la glicemia juega un papel clave (21). La medición por métodos fiables de la glucosa sérica resulta una herramienta clínica fundamental y de allí la importancia de la verificación del desempeño de los métodos que se utilizan para su valoración. En este trabajo se evaluaron dos métodos analíticos utilizados dentro del Servicio de Bioanálisis del Hospital José Gregorio Hernández del IVSS-Caracas, Venezuela, estimando su desempeño in situ y analizando el impacto clínico que el uso de uno u otro método pudiese tener sobre la seguridad del paciente.

La confiabilidad de los métodos en estudio se determinó a través de un protocolo de verificación siguiendo las recomendaciones de organismos especializados en la materia, y que proporciona evidencia objetiva sobre la magnitud de los errores y su significancia clínica (8,11-16, 18, 25-28,30-35).

Los resultados obtenidos en el presente estudio evidenciaron que la imprecisión en condiciones de repetibilidad y de reproducibilidad, para ambas metodologías, cumple con los requerimientos de calidad propuestos por los estándares CLIA´88 y Rilibäk Richtlinie en todos los niveles de decisión clínica. No obstante, al comparar los resultados del CV% entre ambas metodologías, se observó que el método de Glucosa Oxidasa presentó un mejor desempeño.

El estudio de comparación de métodos con muestras de pacientes muestra la existencia de una diferencia

TABLA 5. Veracidad utilizando materiales de referencia para los métodos de Glucosa Hexoquinasa y Glucosa Oxidasa

Método	MRC	Media (mg/dl)	CV%	Intervalo de Verificación	Sesgo	Valor asignado (mg/dl)	U (mg/dl)
Glucosa Hexoquinasa	SH	76,7	3,3	60,0 a 88,0	2,7	74	6
	SHH	186,9	2,9	155,4 a 220,6	-1,1	188	14
Glucosa Oxidasa	SH	74,1	1,8	60,1 a 87,9	0,1	74	6
	SHH	187,2	1,6	155,6 a 220,4	-0,8	188	14

de medias de 1,5 mg/dl entre los métodos evaluados (p<0,0001), la cual no es clínicamente significativa al contrastarla con las especificaciones de desempeño analítico. El análisis de regresión revela que los resultados obtenidos por ambos métodos son comparables o concordantes, no existiendo errores constantes ni proporcionales de importancia estadística ni clínica en todo el intervalo de concentración evaluado (60 a 645 mg/dl) al contrastar los sesgos obtenidos con las metas de calidad analítica (CLIA 88, Richtlinie y VB-min), por lo tanto, los resultados reportados a los pacientes por ambos métodos son transferibles y no comprometen las decisiones médicas. Sin embargo, se pudo observar que el sesgo se incrementa a medida que disminuyen los valores de Glucosa en suero.

Ambas metodologías mostraron un comportamiento lineal, lo cual es claramente verificable mediante la inspección visual de la representación gráfica de los valores obtenidos, además de los resultados del análisis de la regresión polinómica. Por otra parte en ninguno de los casos fue superado el "límite clínico de no linealidad" establecido como el 50% del error total máximo permitido según las especificaciones de calidad de variabilidad biológica (mínimas) (5,21%) (11).

Las interferencias endógenas evaluadas (Hemólisis e Ictericia) afectan de forma desigual a ambos métodos. Se encontró diferencia estadísticamente significativa (IC99%= 6,53 ± 4,48) en la glucosa Oxidasa a una concentración de hemoglobina de 12 g/L. No se encontraron diferencias analíticamente significativas para ninguno de los dos métodos en las concentraciones del interferente estudiadas. Sin embargo, se observaron diferencias clínicamente importantes (d: 6,53) en el método glucosa Oxidasa cuando la concentración del interferente (Hb) alcanzó los 12 g/L. La interferencia analítica descrita a través de la regresión de Passing-Bablok fue positiva para ambos métodos (Hexoquinasa: Conc.GHK=126,09 + 0,15*Interferente y Oxidasa: GOX=122,55 + 0,74*Interferente). El efecto de concentraciones crecientes de Bilirrubina en las determinaciones de Glucosa sérica es más evidente que lo observado en el caso de la hemoglobina. Los valores de glicemia reportados por ambos métodos se afectan de manera clínicamente significativa a partir de una concentración de bilirrubina de 2 mg/dl, siendo la prueba más influenciada la realizada a través del método glucosa Hexoquinasa.

La veracidad de los métodos de glucosa en suero fue verificada a través de la evaluación de material de referencia con valores trazables al método ID-MS, obteniéndose valores de sesgo superiores, aunque no significativos, para la metodología de Glucosa Hexoquinasa.

Conclusiones

A través de este estudio se ha podido verificar que los resultados emitidos por ambas metodologías son transferibles y pueden ser utilizados indistintamente para el reporte de glicemia en el entorno clínico. Los CV% alcanzados cumplen con los requerimientos propuestos por CLIA´88 y Rilibäk Richtlinie y no se observan desviaciones significativas en la veracidad de los métodos que afecten su relevancia médica. Adicionalmente se pudo demostrar que el método de Glucosa Oxidasa tiene un desempeño analítico general superior al método de Glucosa Hexoquinasa.

Agradecimiento

Trabajo financiado con fondos del CDCH. Proyecto PI N-09006715.2007

Referencias

1. OPS/HSP/HSE-LAB. Sistemas de garantía de calidad, conceptos gerenciales para los laboratorios de salud pública. División de desarrollo de sistemas y servicios de salud. Washington D.C. 2002.
2. Terres-Speziale AM. Reingeniería de los Programas de calidad para integrar los procesos de control analítico y relevancia médica. Rev.Mex.Patol.Clin 2006;53(1):3-15.
3. Sociedad Española de Bioquímica Clínica Y Patología molecular. Comisión de instrumentación. Selección Y Evaluación De Sistemas Analíticos. España: Barcelona 1994.
4. Maroto S. Incertidumbre en métodos analíticos de rutina. Facultat de Química. universitat rovira i virgili. tesis doctoral 2002.
5. Westgard J.O., De Vos AJ., Hunt MR., Guan EF., Caney RN. y Garber CC. Concepts and practice in the evaluation of laboratory methods. Background and Approach. Am J. Med Technol. 1978;44:290-300.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. EP6-A 2003. (ISBN 1-56238-498-8). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA
7. International Organization for Standardization. ISO-15189-2012.Medical laboratories Requirements for quality and competence.
8. Ricardo Guglielmone, Rafael de Elías, Oscar Kiener, César Collino, Silvia Barzón. Verificación de métodos en un laboratorio acreditado y planificación del control de calidad interno Acta Bioquím Clín Latinoam 2011;45(2):335-347
9. Lumsden J.H. Laboratory test method validation.

International Society of Animal Clinical Biochemistry. Toulouse, France July 2000 [Plenary Lecture].

10. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular SEQC. Validación metodológica y cálculo de incertidumbre. Aplicación práctica en el caso de elementos trazas Enero 2009.
11. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular SEQC. Recomendaciones para el estudio de la precisión de los procedimientos de medida en el laboratorio clínico. Química Clínica 2003;22(1):33-35.
12. Westgard J.O. Precision and Acurracy: Concepts an assessment by method evaluation testing. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciencies 1981;13:282-330.
13. Instituto de Salud Pública de Chile. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos" Santiago 2010.
14. López Azorín F. La necesidad de mejores evaluaciones metodológicas y nuestra exigencia ante los criterios de aceptabilidad de los resultados. Química Clínica 2003;22(6):431-432. [carta al editor]
15. Glick, M.R., Ryder K.W., Glick S.J. y Woods J. Unreliable Visual estimation of the incidence and amount of tubidity, hemolysis and icterusin serum fron hospitalized patients. Clin Chem 1989;35(5):837-839.
16. Marban, R.M y Pellercer, J.A. Metrología para no metrologos. Organización de Estados Americanos y Sistema Interamericano de Metrología. Segunda Edición 2002
17. Linnet K. Necessary sample size for method comparison studies based on regression analysis. Clin Chem 1999;45(6):882-894.
18. Peterson H., Ricos C, Stockl D. and Libeer JC. Proposed guidelines for the internal quality control of analytical results in the medicine laboratory. Eur J. Clin Chem. Clin Biochem1996;34:383-999.
19. Ricos C, Alvarez V, Cava F, García-Lario JV, Hernández A, Jiménez CV et all. Current databases on biologic variation: Pros Cons guid Progress. Scand J. Clin Lab Invest 1999;59:491-500.
20. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Comité Científico Comisión de Interferencias y Efectos de los Medicamentos. Detección de interferencias y otros errores en la medición de la glucemia en glucómetros portátiles Recomendación 2012.
21. Asociacion Latinoamericana de Diabetes. ALAD. Guías ALAD sobre el Diagnóstico, Control y Tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2 con Medicina Basada en Evidencia Edición 2013
22. Salve M., Amich S, Prieto S y Casas A. Manual de Laboratório Clinico Básico. Ediciones McGraw Hill 2002.
23. Clinical and Laboratory Standard Institute. User verification of performance for precision and trueness; Aproved Guideline – Second edition. CLSI Document EP15-A2. Clinical and Laboratory Standard Institute Pennsylvania USA 2005.
24. Clinical and Laboratory Standard Institute. Interference testing in clinical chemistry; Aproved Guideline – Second edition. CLSI Document EP7-A2. Clinical and Laboratory Standard Institute Pennsylvania USA 2005
25. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Actualización en la selección y evaluación de sistemas analíticos ISBN: 84-89975-48-5- febrero 2013.
26. Westgard J.O and Burnett RW. Precision requerements for cost-effective operation of analytical processes. Clin Chem 1990;36:1629-1632.
27. Westgard J.O. A method evaluation decision chart (medxchart) for judging method performance. Clinical Laboratory Science. 8(5) 277-283 sept/oct 1995
28. Westgard, J. Method validation- the linearity or reportable range experiment 2000 [Documento en línea] Disponible en: http://www.westgard.com/lesson26.htm. [Consulta: 2004, Febrero 10]
29. Westgard, J. y Quam, E. Method validation -the interference and recovery experiments (2000) [Documento en línea] Disponible en: http://www.westgard.com/lesson27.htm. [Consulta: 2004, Febrero 10]
30. FONDONORMA. Covenin-ISO 15189:2007. Requisitos particulares para la calidad y competencia de laboratorios clínicos.
31. National Committee for Clinical Laboratory Standards. NCCLS. Evaluation of Precision performance of clinical chemistry devises. Aproved Guideline NCCLS Document EP5-A. NCCLS Pennsylvania USA 1999
32. National Committee for Clinical Laboratory Standards. NCCLS. Method comparison and bias estimation using patient samples; Aproved Guideline NCCLS Document EP9-A. NCCLS Pennsylvania USA 1995
33. Glick M., Ryder K. y Jackson S. Graphical comparisons of interference in clinical chemistry instrumentation. Clini. Chem. 32(3) 470-475 1986
34. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular Comité Científico. Recomendaciones para el estudio de la veracidad de los procedimientos de medida en el laboratorio clínico mediante la utilización de materiales de referencia. 2010.