

VERIFICACIÓN DEL INTERVALO DE MEDICIÓN DE UN MÉTODO DIAZO PARA DOSAR BILIRRUBINA SÉRICA EN UN HOSPITAL PÚBLICO POLIVALENTE DE LA PROVINCIA DE CÓRDOBA

Gimenez J¹; Giorgini MF²; Mladin J³; Ligorria S⁴

RESUMEN

Introducción: El protocolo que utilizan la mayoría de los fabricantes para establecer su característica de desempeño sobre linealidad, o los laboratorios para verificar un intervalo de medición propuesto por el fabricante, está basado en la guía documento Protocolo de Evaluación 06 – A (EP 06-A) del Instituto de Estándares Clínicos de Laboratorio (CLSI). La linealidad se evalúa en aspectos estadísticos y aspectos clínicos, siendo de interés primordial la evaluación clínica. Debido a la asistencia de neonatos al Hospital Polivalente, cuyos valores de bilirrubina sérica total (BST) abarcan todo el rango de medición de concentraciones, es de sumo interés este análisis. **Diseño:** Trabajo experimental, analítico y transversal. **Entorno:** Hospital Misericordia de la Provincia de Córdoba. **Materiales y métodos:** Se utilizó el programa LinCkecker, una muestra de concentración alta (lo más próxima al límite superior de concentración declarado por el fabricante) y muestra de concentración baja. Se preparó una serie de 5 diluciones a partir de estas dos, siguiendo el protocolo EP 06-A. **Objetivo:** Verificar el intervalo de medición del método diazo para BST y enfatizar la utilidad e importancia de esta herramienta de calidad. **Resultados:** El análisis de regresión lineal para el método diazo que determina BST, arrojó un polinomio de cuarto orden y un error máximo de no linealidad del 1.56 %. **Conclusión:** Se identificó que el intervalo de medición que abarca de 0 a 25 mg/dL, no es estadísticamente lineal. Sin embargo, al evaluar el error de no linealidad y enfrentarlo a la especificación de calidad, se concluyó que no excede el error sistemático permitido del 4.5 %, por lo que se puede realizar el ajuste lineal en el rango de concentraciones propuesto.

Palabras clave: Bilirrubina sérica total (BST), Instituto de Estándares Clínicos de Laboratorio (CLSI), Protocolo de Evaluación (EP06-A), Error total permitido (ETp), Error sistemático aceptable (ESa), Linealidad (LIN).

¹Bioquímico Especialista, Jefe de Residente en sección de Química Clínica – Laboratorio de Análisis Clínicos - Hospital Misericordia Nuevo Siglo - Córdoba - Argentina.

²Bioquímica Especialista encargada de Nefrología y Medio Interno - Laboratorio de Análisis Clínicos – Hospital Misericordia Nuevo Siglo – Córdoba - Argentina.

³Bioquímico especialista encargado de la sección Química Clínica y control de calidad - Laboratorio de Análisis Clínicos – Hospital Misericordia Nuevo Siglo – Córdoba - Argentina.

⁴Bioquímica Jefa del Servicio de Laboratorio – Hospital Misericordia Nuevo Siglo – Córdoba - Argentina.

✉ Giménez, José María
pp_8829@hotmail.com

BIOQUINFORMA DIGITAL

Publicación on-line del Colegio de Bioquímicos de la Provincia de Córdoba (ISSN: 2344-9926)

INTRODUCCIÓN

El Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI), es una organización que busca fomentar la excelencia en medicina desarrollando e implementando pautas que ayuden a mejorar la calidad de las pruebas que realizan los laboratorios. En este contexto, el protocolo de evaluación 06-A (EP06-A) guía a los usuarios para la evaluación de la linealidad (LIN) o la verificación del intervalo de medición determinado previamente por el fabricante,

controlando las condiciones de precisión y veracidad. ⁽¹⁾

Se ha desarrollado una amplia variedad de métodos analíticos y estadísticos para estimar la salida del experimento de LIN. Los métodos para la interpretación de los datos han evolucionado a lo largo de los años desde la simple inspección visual hasta el análisis de regresión estadística polinomial. ^(2, 3, 4)

Las técnicas han sido ampliamente revisadas por Tholen DW y Martin H. Kroll (médicos y profesores de patología en Boston), autores de la mayoría de los artículos publicados respecto al análisis de LIN. ^(4,5)

El método más comúnmente utilizado para interpretar los resultados de un experimento de LIN es la revisión visual de un gráfico de los valores medidos versus el valor verdadero para cada nivel de dilución, teniendo la expectativa de que los valores del eje Y (valor medido u observado) estén lo más cerca posible de los valores del eje X (valor verdadero). La evaluación se basa en el grado en que los datos siguen una línea recta. ^(2, 3, 5)

El análisis dice que el método es lineal cuando la recuperación del analito de interés (valor medido u observado), es linealmente proporcional a la concentración o contenido real del mismo (valor real) en la serie de diluciones generadas. ⁽³⁾

Para la verificación del rango lineal, como en América Latina no existe accesibilidad a estándares comerciales ya preparados en 5 o 7 concentraciones diferentes del analito de interés que simplifiquen el trabajo, generalmente se trabaja con un protocolo alternativo conocido como protocolo de concentraciones equidistantes, para lo cual se necesita una muestra de concentración alta, una muestra de concentración baja y/o diluyente, el inserto del fabricante, un software para el análisis estadístico, haber establecido un requisito de calidad para el procedimiento de medida y contar con material volumétrico correcto para las diluciones que se generan.

La evaluación de la LIN, aunque no reciba la atención que se merece, es una herramienta necesaria para satisfacer los requisitos regulatorios de garantía de calidad en el laboratorio clínico. ⁽⁶⁾ Desafía todo el rango de medición incluyendo los extremos, y puede detectar problemas como el deterioro del espectrofotómetro o el de los reactivos, inclusive una inadecuada calibración. ⁽⁷⁾

Por tratarse de bilirrubina, cuyo dosaje es uno de los exámenes de laboratorio más frecuentes llevados a cabo en los recién nacidos (RN), los cuales poseen niveles elevados de BST que suelen rondar o estar cercano al límite de linealidad superior propuesto por el fabricante, es de sumo interés la verificación del rango lineal en el laboratorio de análisis clínicos del Hospital Polivalente, para la mejor calidad en la prevención y tratamiento de la hiperbilirrubinemia. ⁽⁸⁾

Objetivos:

Objetivo General:

Verificar el intervalo de medición del método diazo usado rutinariamente para dosar bilirrubina sérica total (BST).

Objetivo Secundario:

Enfatizar sobre la utilidad e importancia de evaluaciones de LIN para pruebas clínicas como herramienta de calidad en la prevención y tratamiento clínico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio

Trabajo experimental, analítico y transversal.

Muestra

Se utilizó una muestra de concentración alta (próxima al límite superior declarado por el fabricante) y muestra de concentración baja cercana al límite de cuantificación de bilirrubina propuesto por el fabricante (0.10 mg/dL). A partir de estas muestras, se preparó una serie de 5 diluciones, siguiendo el protocolo de concentraciones equidistantes para cubrir de manera homogénea todo el intervalo de medición. Se trabajó con volúmenes finales entre 100 - 150 μ L y material volumétrico (micropipeta automática DRAGONLAB ajustable de 5 – 50 μ L y 100 μ L) calibrada, homogenizando correctamente las diluciones antes de procesar las muestras.

Se obtuvo así para cada una de las 5 diluciones, una concentración teórica. Además, estas se procesaron por triplicado utilizando el método diazo para BST mediante el autoanalizador Architect C4000; y cargando en el software todos los valores obtenidos y calculados, el programa informático realizó un gráfico de X e Y. En X se correspondieron los valores teóricos y en Y los medidos por triplicado. Se evaluó finalmente el intervalo de medición tanto lineal como

clínicamente, debido a que el programa también arrojó en porcentaje el error de no linealidad vinculado al error sistemático, el cual se lo comparó con el requisito de calidad establecido en la base de datos de variabilidad biológica en condiciones óptimas de trabajo para BST.

Criterios de Inclusión y de exclusión:

Criterios de inclusión: Muestra de paciente con concentración elevada, próximo al límite superior declarado por el fabricante; y muestra de concentración baja cuyo valor, este cercano al límite de cuantificación establecido por el fabricante.

Criterios de exclusión: Muestra de concentración baja con cantidad del analito menor o muy diferente del límite de cuantificación y muestra de concentración alta mayor o lejana al límite superior declarado por el fabricante. Muestra hemolizada o lipémica, serán excluidas por producir interferencia en la medición de BST, generando falsos positivos.

Requerimiento de calidad e interpretación de LIN

El requisito de calidad para BST establecido en la base de datos según variabilidad biológica en condiciones óptimas de trabajo es del 13.5% como error total máximo permitido (ETp). De ese error, se le atribuye un 4.5 % al BIAS % o error sistemático permitido (ESp). Este presupuesto de error parte de considerar a la variabilidad biológica individual y grupal involucrados en la siguiente formula:

$$\text{BIAS \%} < 0.125 (\text{CV individual}^2 + \text{CV grupal}^2)^{1/2}$$

En el caso de una no linealidad estadísticamente significativa, el programa LinCkecker calcula una "desviación estándar" entre la curva de calibración real y una línea teórica en el rango reportable (depende de todas las desviaciones elementales a la linealidad), generando una no linealidad máxima como error. Si el error de no linealidad arrojado por el estadístico utilizado es menor al BIAS % establecido, se concluye que el procedimiento de medida se ajusta linealmente en el rango de concentraciones establecido por el fabricante.

Análisis Estadístico

Se utilizó el programa informático LinCkecker versión 1.1.2 (Copyright ©2001 by Philippe Marquis, Metz, France) para procesar los

datos. Éste, realiza la verificación de linealidad tanto estadística como clínica (si así se requiere).

Métodos

Método químico, determinación de BST: Las muestras o diluciones equidistantes generadas se midieron con metodología marca Abbott, que implementa modificaciones del método diazo y se aplica rutinariamente en la práctica diaria. Las características específicas son: linealidad de 0.10 mg/dL a 25 mg/dL (verificada utilizando la guía protocolo de evaluación EP6 – A del Instituto de Estándares Clínicos de Laboratorio), imprecisión tal que el coeficiente de variación porcentual (CV %) total es menor o igual al 5 %, según la guía EP5 – A2 de la CLSI. Se utilizó el autoanizador Architect C4000.

RESULTADOS

Los resultados calculados y obtenidos mediante el procesamiento de los triplicados de las 5 diluciones por el método diazo para BST en el autoanizador Architect C4000, se cargaron en el software LinCkecker como lo muestra la **Tabla 1**, en donde se puede visualizar el nombre del laboratorio, la fecha de realizado el protocolo, el método con el cual se trabajó, las unidades de medida, el requerimiento de calidad, la cantidad de diluciones con las que se trabajó, la concentración alta y baja de las que surgieron todas las diluciones, la asignación que se le dió a la línea de referencia de seguir una recta de orden 1; y debajo de todo, las concentraciones teóricas y observadas por triplicado.

Se obtuvo un gráfico de X (valores teóricos) y de Y (valores medidos u obtenidos) en donde el programa trazó la curva que mejor ajusta todos esos puntos, la cual fue de orden 4 como lo muestra el análisis de regresión polinomial de la **Tabla 2** y el grafico de la **Figura 1**. La línea roja es la recta de referencia, mientras que la línea azul representa la curva obtenida. Se observa visualmente una diferencia entre ambas curvas debida al error de no linealidad. En el margen superior izquierdo de la figura está indicado que el método no es lineal, referido a una linealidad estadística.

Debido a ello, el software realizó un segundo análisis de los datos y calculó el error de no linealidad máxima en base a todas las desviaciones elementales a la linealidad, el cual arrojó un valor del 1.56% como lo muestra la **Tabla 3**. Este valor se comparó con el requisito de

calidad de BIAS % presupuestado igual al 4.5%, y se concluyó que el procedimiento de medida se puede ajustar de forma lineal en el rango de concentraciones evaluado, considerando que tiene validez clínica basándonos en la base de datos para variabilidad biológica óptima.

DISCUSIÓN

Los laboratorios deben garantizar la confiabilidad de los resultados que arrojan, por ello cuando falla la evaluación de linealidad, se deben realizar acciones correctivas que dependerán del analito, del método y la extensión de la no linealidad.

Dado que cada situación es diferente, y que el error puede deberse a cualquiera de las etapas del proceso de laboratorio, se sugiere que durante los pasos preanalíticos, el error humano sea minimizado.

Respecto a la etapa analítica, el error puede surgir de varios pasos del proceso. Un buen punto de partida es verificar el mantenimiento, el control de calidad y los registros de calibración durante el período anterior a la prueba de linealidad. Esto puede proporcionar cierta evidencia y dirección para encontrar y corregir la fuente que podrá ser la causante de un bajo rendimiento en la evaluación de LIN. Los problemas más comunes incluyen un desplazamiento de la longitud de onda del espectrofotómetro, una óptica sucia o envejecida ya sea de la lámpara o de las cubetas; y una inadecuada calibración. ⁽¹¹⁾ También pueden surgir problemas si los reactivos están vencidos o cercanos al final de su vida útil. ^(9, 10)

El método polinomial utiliza objetivos clínicamente relevantes para evaluar el rango analítico de medida y tiene la capacidad de detectar problemas antes de que ocurran fallas en las mediciones que repercutirán en el diagnóstico médico sin poder las mismas, ser prevenidas en el control de calidad diario, debido a que en el mismo, no se cubren los niveles de decisión médica, sobre todo el nivel alto, indispensable para el diagnóstico de hiperbilirrubinemia (HBIL) en recién nacidos. Por lo tanto, las correcciones de la no linealidad pueden garantizar un resultado de laboratorio preciso y confiable, lo cual es fundamental para el cuidado de la salud. Por tal motivo, se debe concientizar sobre la realización de una verificación de LIN, sobre todo en los casos en donde el analito en cuestión arroja resultados de pacientes que cubran todo el intervalo de medida propuesto por el fabricante,

principalmente si están cercanos al límite superior del intervalo. ⁽⁷⁾

En conclusión, se verificó en el Hospital Misericordia Nuevo Siglo de la Provincia de Córdoba, que el método diazo para medir bilirrubina no es estadísticamente lineal en el rango de concentraciones especificadas. Sin embargo, el método se puede ajustar de forma lineal en el rango de concentraciones propuesto por el fabricante, debido a que el error de no linealidad arrojado por el estadístico utilizado es menor al BIAS % establecido, lo que indica que los resultados arrojados no repercutirán clínicamente de forma adversa.

El error de no linealidad más alto de 0.34 mg/dL de concentración se dio a un valor pico de 21.33 (tabla 3). A pesar que no repercute en la toma de decisiones médicas, en ese pico de máximo error, no existen controles de calidad disponibles comercialmente, por lo que insistimos en la importancia de realizar la verificación de LIN, principalmente en aquellas instituciones donde asisten RN para el control y prevención de Hiperbilirrubinemia. Además, enfatizamos con la puesta en práctica de un control cercano al nivel de decisión médica de concentración alta de BST, para detectar errores que puedan ocurrir en el día a día. ^(3, 5, 12)

La experiencia indica que además de solventar los mantenimientos de los equipos como la etapa preanalítica de este analito fotosensible, es fundamental que la etapa analítica sea la correcta. La encefalopatía aguda por HBIL es causa de muerte neonatal y puede dejar secuelas permanentes en los sobrevivientes.

El kernicterus (definición reservada para las manifestaciones crónicas por HBIL), aunque es una patología totalmente prevenible, sigue ocurriendo en el mundo debido a una inadecuada prevención, del cual nosotros como Bioquímicos somos partícipes; por lo que debemos estar involucrados y ser los responsables de generar resultados confiables para el diagnóstico médico y el tratamiento que el paciente merece. ^(13, 14)

La inspección visual de la ictericia en la piel como evaluación clínica es inexacta y subjetiva, por lo que es propicio crear un ambiente de confianza y una relación interdisciplinaria médico – bioquímico que evite perjudicar al paciente con una conducta clínica errónea. ⁽¹⁵⁾

La HBIL es la causa más frecuente de reinternación en el RN, que conlleva a complicaciones graves y gastos públicos extras e innecesarios en las políticas de salud, por lo que

es nuestra responsabilidad además de tener un rol protector, enfatizar que la cuantificación de BST sigue siendo el Gold Estándar.^(16, 17)

Una limitación del trabajo fue que, por la dificultad de conseguir una muestra de concentración alta de gran volumen, se procedió a realizar un pool de suero con muestras de neonatos de BST cercano al límite de linealidad asignado por el fabricante de reactivos. En el protocolo alternativo de concentraciones equidistantes sin embargo, se recomienda trabajar siempre con volúmenes grandes para evitar errores por dilución.

AGRADECIMIENTOS

Gracias

A mi madre, por decirme siempre que puedo, y hacérmela creer tanto que al buscar entre sueños, alguno se me vuelve realidad.

Gracias

A mis sobrinos, Delfina y Mateo, que me llenan de amor y me dan fuerzas para seguir adelante a pesar de las adversidades que puedan llegar a asomar. Por transformar mis tropezos en saltos, y mi edad en niñez.

Gracias

A la Dra. Silvia Ligorria por haberme dado la posibilidad de llegar hasta este punto de inflexión, con las mismas y más ganas que ayer, haciendo lo que amo.

Gracias

A mis colegas, amigos y excelente equipo del Laboratorio Central del Hospital Misericordia, que estimulan mi aprendizaje y superación día a día; al igual que mi sonrisa

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Wayne, Pa: NCCLS, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach". Approved guideline NCCLS document EP6-A (ISBN1-56238-498-8). 2003.
- Kroll MH, Emancipator K. "A theoretical evaluation of linearity". Clin Chem.1993; Mar 39 (3):405-13.
- Kroll MH, Praestgaard J, Michaliszyn E, Styer PE. "Evaluation of the extent of nonlinearity in reportable range studies". Arch Pathol Lab Med. 2000; 124:1331-1338.
- Tholen DW. "Alternative statistical techniques to evaluate linearity". ArchPathol Lab Med. 1992; 116:746-756.
- Kroll MH, Emancipator K. A theoretical evaluation of linearity. Clin Chem.1993; 39:405-413.
- Jeffrey S. Jhang, MD; Chung-Che Chang, MD, PhD; Daniel J. Fink, MD, MPH; Martin H. Kroll, MD. "Evaluation of Linearity in the Clinical Laboratory". College of Physicians and Surgeons of Columbia University. Arch Pathol Lab Med—Vol 128, January 2004.
- Kroll M, Gilstad C, Gochman G, et al, eds. "Laboratory Instrument Evaluation, Verification and Maintenance Manual". 5th ed. Northfield, Ill: College of American Pathologists; 1999:1.
- American Academy of Pediatrics. Guía de práctica clínica. Subcomité para la hiperbilirrubinemia. Manejo de la hiperbilirrubinemia en el recién nacido de 35 o más semanas de gestación. Pediatrics, Vol. 114, N° 1 – Julio 2004.
- Carl A. Burtis PhD, Edward R. Ashwood MD, David E. Bruns. Tietz. "Fundamentals of Clinical Chemistry", sixth edition.
- Lawrence Kaplan and Amadeo Pesce. "Theory, Analysis, Correlation Clinical Chemistry". 5th Edition.
- Kroll M, Gilstad C, Gochman G, et al, eds. Laboratory Instrument Evaluation, Verification and Maintenance Manual. 5th ed. Northfield, Ill: College of American Pathologists; 1999:1.
- Vaks JE. Preparation of samples with equally spaced concentrations through mixing. Clin Chem 1996; 42: 1074-8.
- Audrey K. Brown. Kernicterus: "Past, Present, and Future". Neo Reviews 2003; 4; 33.
- MARTA HERNÁNDEZ CH, M. IGNACIA SCHMIDT C., ISIDRO HUETE L. Encefalopatía por Kernicterus. Caso Clínico. Rev. Chil. Pediatr 2013; 84 (6): 659-666.
- American Academy of Pediatrics. Guía de práctica clínica. Subcomité para la hiperbilirrubinemia. Manejo de la hiperbilirrubinemia en el recién nacido de 35 o más semanas de gestación. Pediatrics, Vol. 114, N° 1 – Julio 2004.
- Ogas, Marcela del Valle; Campos, Andrea Campos y Ramacciotti, Susana. HIPERBILIRRUBINEMIA EN EL RECIÉN NACIDO. Servicio de Neonatología - Hospital Universitario de Maternidad y Neonatología.

Facultad de Ciencias Médicas –
UNC.Septiembre 2006.

17. Xie B, da Silva O, Zaric G. “Cost-effectiveness analysis of a system-based approach for managing neonatal jaundice and preventing kernicterus in Ontario”.; Vol 17 (1): 11-16. Paediatr Child Health, 2012.

Tabla 1: Resultados de las concentraciones teóricas y observadas.

Demographics

Lab name: HOSPITAL MISERICORDIA NUEVO SIGLO

Date: 19/05/2019 Operator: GIMENEZ JOSE M

Method: DIAZO MODIFICADO Unit: mg/dl

Comment: ET a 13.5 % ; BIAS 4.5 % (VARIABILIDAD BIOLOGICA OPTIMA).

Assigned values

Nb: 5 Autofill equidistant

Low: 0.16 High: 24.10 Apply

Reference line

None 1st order Calibration

Low cal: High cal: Apply

Dilution	Assigned	Replic 1	Replic 2	Replic 3	Replic 4	Replic 5	Replic 6
1	0,16	0,16	0,17	0,14			
2	6,145	6,19	6,28	6,13			
3	12,13	11,66	11,65	12,01			
4	18,115	18,28	18,19	18,10			
5	24,1	24,40	24,25	23,59			

Tabla 1: Tabla extraída y adaptada del programa estadístico LinCkecker, basado en la teoría de la linealidad y en la medida del error de no linealidad propuesto por Kroll H.

Figura 1: Regresión polinomial.

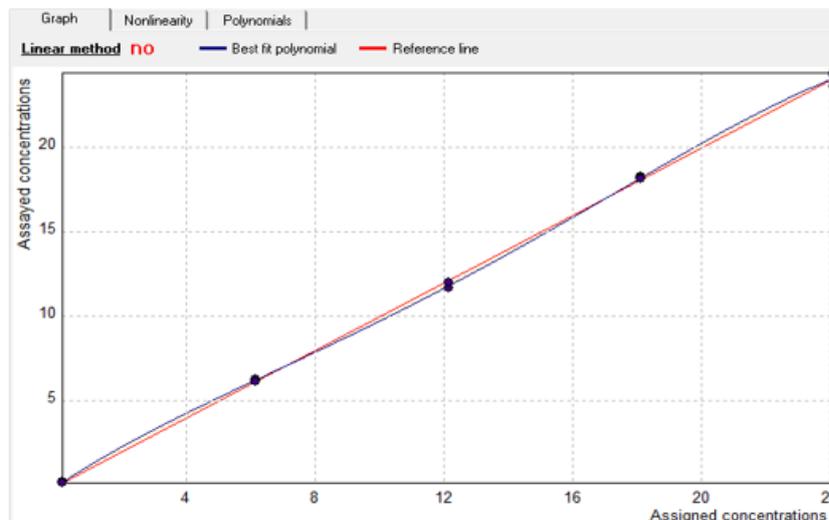


Figura 1: Grafico extraído y adaptado del programa estadístico LinCkecker, basado en la teoría de la linealidad y en la medida del error de no linealidad propuesto por Kroll H.

Tabla 2: Análisis de regresión polinomial.

Graph		Nonlinearity	Polynomials			
Best fit polynomial regression: $y = -0,04235 + 1,254 x - 0,06123 x^2 + 0,004206 x^3 - 8,714E-5 x^4$						
Coefficient	Value	SE	t-test	Probability	Significan...	SE of regr...
Order 1						
Δ^0	-0,0473	0,1157	-0,409	0,689	NS	
b^1	0,9998	0,007822	127,810	0,000	S	0,2564
Order 2						
Δ^0	0,0335	0,143	0,234	0,819	NS	
b^1	0,9738	0,02799	34,795	0,000	S	
Δ^2	0,00107	0,001107	0,966	0,353	NS	0,2571
Order 3						
Δ^0	0,04027	0,1603	0,251	0,806	NS	
b^1	0,9668	0,06752	14,319	0,000	S	
Δ^2	0,001872	0,007026	0,266	0,795	NS	
Δ^3	-2,203E-5	0,0001904	-0,116	0,910	NS	0,2683
Order 4						
Δ^0	-0,04235	0,1354	-0,313	0,761	NS	
b^1	1,254	0,1263	9,927	0,000	S	
Δ^2	-0,06123	0,02563	-2,389	0,038	S	
b^3	0,004206	0,001681	2,502	0,031	S	
b^4	-8,714E-5	3,449E-5	-2,526	0,030	S	0,2199

Tabla 2: Tabla extraída y adaptada del programa estadístico LinCkecker, basado en la teoría de la linealidad y en la medida del error de no linealidad propuesto por Kroll H.

Tabla 3: Error de no linealidad

Polynomial regression

Graph		Nonlinearity	Polynomials		
— Best fit polynomial	Nonlinearity error	Peak X=21,33	Overall (EK)	Unit	
— Reference line	Dimensional	0,34	0,225		
	Relative	1,56	0,94	%	

Tabla 3: Tabla extraída y adaptada del programa estadístico LinCkecker, basado en la teoría de la linealidad y en la medida del error de no linealidad propuesto por Kroll H.