

LINEAMIENTOS TÉCNICOS PARA EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYO VERSIÓN 02

Componente: Anexo 01 Evaluación métodos ELISA del fabricante

SUBDIRECCIÓN DE GESTIÓN DE CALIDAD DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA

DIRECCIÓN DE REDES EN SALUD PÚBLICA

Elaborado por: Jeannette Cristina Forero - Diana Patricia Martínez. Profesionales DRSP

Revisado por: Esther Cristina Barros, Ángela Coronado, Responsables Técnicos Grupos INS
Virología, Microbiología, Química y Toxicología

Aprobado por: Claudia Llerena Polo – Directora Técnica (E) RSP

Diciembre 2018

1. INTRODUCCIÓN

Los lineamientos que se aportan en este documento corresponden a diferentes alternativas para evaluar las características de desempeño de los métodos de ELISA del fabricante, en coherencia con las recomendaciones de organismos de reconocida competencia técnica.

Es importante tener en cuenta que la ejecución de ensayos de ELISA en el marco de la misionalidad de los LSP está orientada a los eventos de interés en Salud Pública, situación que puede requerir adaptaciones de los modelos referenciados en la bibliografía relacionada, en especial, los abordados por el Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI), cuyo campo de aplicación se especializa en el laboratorio clínico. De igual forma, en algunos casos las opciones de abordaje se extractan de versiones bibliográficas diferentes a la vigente; sin embargo, a la luz de la practicidad y aplicabilidad, siguen siendo excelentes alternativas para el análisis de datos; en cualquier caso, queda a criterio del usuario de este documento, el aporte de valor a sus propios esquemas.

Por lo anterior, los criterios que se aportan en este documento recopilan las recomendaciones emitidas en la bibliografía y se enriquecen con las experiencias de evaluación de métodos que se han llevado a cabo en el Instituto Nacional de Salud, como parte de los procesos de acreditación de ensayos y el fortalecimiento de los esquemas de aseguramiento de la validez del resultado.

2. OBJETIVO DEL LINEAMIENTO

Presentar criterios orientativos que permitan a los Laboratorios de Salud Pública (LSP) planificar y desarrollar ejercicios de evaluación de métodos de ensayo de ELISA desarrollados por el fabricante.

3. ALCANCE DEL LINEAMIENTO

Los criterios de evaluación de carácter cualitativo y cuantitativo para métodos ELISA del fabricante.

4. DEFINICIONES ESPECÍFICAS

- **Acuerdo:** corresponde a la probabilidad de encontrar el mismo resultado en dos muestras idénticas, analizadas en el mismo laboratorio, bajo condiciones de repetibilidad. [ISO 16140-1]
- **Analito:** componente representado por un nombre o una cantidad medible. [EP12-A2 / ISO 17511]

NOTA — También puede ser entendido como la característica medida en la muestra de ensayo.

NOTA DEL LABORATORIO — Esta definición se alinea con la correspondiente a MENSURANDO definida en VIM 2012.

- **Concordancia:** corresponde a la probabilidad de encontrar el mismo resultado en dos muestras idénticas, cuando son analizadas en condiciones de reproducibilidad o precisión intermedia. [ISO 16140-1]

- **Control/Material de control:** un dispositivo, solución o preparación liofilizada prevista para el uso en el proceso de control de calidad [CLSI EP12-A2].

NOTA 1 — La reacción esperada o concentración del analito de interés es conocida dentro de los límites determinados durante el proceso de preparación y confirmación para el uso previsto.

NOTA 2 — Los materiales de control no deben ser usados para calibración dentro del mismo proceso en que se usen como controles.

- **Criterio de exactitud diagnóstica:** el mejor criterio disponible para establecer la presencia/ausencia de una condición, evento o característica de interés usando un solo método o una combinación de métodos que incluyen ensayos de laboratorio, imágenes diagnósticas, patología e información clínica. [CLSI EP12-A2].
- **Punto de corte:** para ensayos cualitativos, el límite (umbral) por encima del cual el resultado es reportado como positivo y por debajo del cual es reportado como negativo. [CLSI EP12-A2].
- **Especificidad:** el porcentaje (fracción multiplicada por 100) de sujetos SIN la condición target (determinada por criterio exactitud diagnóstica) cuyos resultados de ensayo son negativos. [CLSI EP12-A2]
- **Exactitud diagnóstica (índice de validez o proporción correcta de aciertos):** grado de acuerdo entre la información generada desde el ensayo bajo evaluación y el criterio de exactitud diagnóstica. [CLSI EP12-A2].
- **Falso negativo (FN Número de resultados falsos negativos):** resultado negativo para una muestra cuya condición de interés (analito/mensurando) está presente (determinada por Criterio de exactitud diagnóstica). [Adaptado CLSI EP12-A2].
- **Falso positivo (FP Número de resultados falsos positivos):** resultado positivo para una muestra cuya condición de interés (analito/mensurando) está ausente (determinada por Criterio de exactitud diagnóstica). [Adaptado CLSI EP12-A2].
- **Límite del blanco:** el resultado de medición más alto que probablemente se observe (con una probabilidad establecida α) para una muestra blanco. [EP12-A2].
- **Propiedad cualitativa,** f, cualidad, m: propiedad de un fenómeno, cuerpo o sustancia, que no puede expresarse cuantitativamente. [VIM 2012]

EJEMPLO 1 Sexo de una persona.

EJEMPLO 2 Color de una muestra de pintura.

EJEMPLO 3 Color de un indicador de ensayo (spot test) en química.

- **Sensibilidad:** el porcentaje (fracción multiplicada por 100) de sujetos CON la condición target (determinada por criterio exactitud diagnóstica) cuyos resultados de ensayo son positivos. [CLSI EP12-A2]
- **Selectividad:** capacidad del método para producir una respuesta para el analito de interés distinguible de las otras respuestas de los demás componentes de una mezcla potencialmente compleja. [AEFI 2001].

NOTA — La especificidad se utiliza como sinónimo de la selectividad, aunque debería reservarse para aquellas situaciones donde la respuesta obtenida solo se puede producir con una única entidad química.

- **Sesgo (Bias):** diferencia entre los resultados obtenidos por un método de ensayo y el valor de referencia aceptado. [CLSI EP12-A2/ISO 3534-1].

5. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS A INCLUIR EN EL PANEL DE EVALUACIÓN

En los ejercicios pueden ser incluidos materiales de referencia comerciales o enviados en el marco de ensayos de aptitud en caso de estar disponibles y en todos los casos deben ser incluidas muestras rutinarias que representen las matrices que típicamente se utilizan en la práctica (sangre total, suero, plasma, sangre en papel de filtro, etc.), las cuales deben a su vez, estar incluidas en las categorías/tipos de muestra declaradas como aplicables al ensayo por parte del fabricante.

El criterio de caracterización real del panel de muestras (criterio de exactitud diagnóstica) a analizar puede incluir, pero no se limita a:

- **Caracterización por proveedor externo.** Corresponden a los paneles de referencia disponibles comercialmente los cuales están caracterizados cualitativamente; en algunas ocasiones se detalla el resultado en forma cuantitativa, condición que favorece la selección de muestras con “bajos” contenidos del mensurando target.
- **Caracterización por comparación Interlaboratorios.** Corresponden a muestras (naturales o sintéticas) cuya caracterización se ha realizado por varios laboratorios en el marco de un programa de comparación interlaboratorios. Constituyen un material confiable para la evaluación del método dado el contexto en que se genera la caracterización real de las mismas.
- **Caracterización por criterio clínico y valoración por metodologías de mayor jerarquía metrológica, valoradas por plataformas de ensayo diferentes a la que se encuentra bajo estudio o utilizando estuches comerciales de otros fabricantes.** Las muestras rutinarias allegadas para estudio pueden ser valoradas por metodologías diagnósticas y/o confirmatorias que proporcionan la caracterización real de la muestra; de igual forma es válido incorporar el análisis de caso desde el punto de vista clínico y epidemiológico, para asumir como confiable la caracterización respectiva, revisando cuidadosamente la evolución clínica de la patología asociada.

6. TAMAÑO DE MUESTRA

El tamaño de muestra a trabajar en el ejercicio de evaluación de este tipo de métodos se debe determinar teniendo en cuenta la información de validación primaria suministrada por el fabricante para asegurar la adecuación al uso previsto, así como si se identifica la necesidad de modificar alguna variable en la ejecución del ensayo por una causa técnicamente justificable.

Las muestras deben tener diferentes concentraciones del mensurando target, preferiblemente los que representan puntos de decisión clínica (puntos de corte), límites de referencia, o simplemente caer en regiones normales y anormales; es decir se debe propender por verificar las características de desempeño del método en todo el intervalo de medición en coherencia con el comportamiento serológico de la patología asociada y teniendo en cuenta la viabilidad de obtención. Opciones óptimas para el número de muestras y sus niveles de concentración dependerán de cómo la precisión varía a través de dicho intervalo. En cualquier caso, es aconsejable evitar niveles extremos que requieran extrapolar. [CLSI EP 15 A3].

La selección y distribución (No. muestras positivas/ No. muestras negativas) debe hacerse de manera equitativa, opcionalmente también se puede considerar la prevalencia de la enfermedad [CLSI-EP12-A2], lo cual permite evaluar equilibradamente la sensibilidad y especificidad estimadas del método.

Según el escenario a trabajar y en coherencia con los criterios documentados en el Lineamiento ESTRATEGIAS PARA LA CONSTRUCCIÓN DE DISEÑOS EXPERIMENTALES DE VALIDACIÓN VERSIÓN 01 emitido en 2016 y otros complementarios, se sugieren las siguientes estrategias para determinar el tamaño de muestra para el desarrollo del ejercicio, respecto a la evaluación de parámetros (precisión y veracidad). Para evaluación de fases particulares se presentan las opciones de tamaño de muestra en el respectivo apartado de abordaje:

6.1. Verificación de un método del fabricante con soporte robusto de validación primaria

Cuando el fabricante suministra información de estudios internos y externos aplicados al método utilizando un tamaño de muestra **superior** a 30 muestras procesadas, se asume una evaluación robusta de desempeño del método.

En estos casos se establece procesar mínimo un $n \geq 33$ de muestras positivas y un equivalente de muestras negativas; este tamaño de muestra permite tener un número de datos estadísticamente válido para inferir el comportamiento de una población y adicionalmente suministra un margen razonable (10%) para sustracción de datos atípicos.

6.2. Verificación de un método del fabricante sin soporte robusto de validación primaria

Cuando el fabricante suministra información de estudios internos y externos aplicados al método con un tamaño de muestra **inferior** a 30 muestras procesadas, no se puede tener certeza del nivel de robustez con el cual se desarrolló la validación primaria, por tanto, es prudente adoptar criterios más estrictos para evaluar el método.

En estos casos se establece procesar mínimo un $n \geq 55$ de muestras positivas y un equivalente de muestras negativas, adoptando el criterio detallado en el documento CLSI EP12 A2 e incluyendo un margen razonable (10%) para sustracción de datos atípicos.

6.3. Validación de modificación de un método del fabricante

En algunos casos específicos y mediando una justificación técnicamente válida, puede ser necesario ajustar una variable en el proceso de ejecución del método (por ejemplo, tiempos de incubación). Para realizar una evaluación del impacto de la modificación implementada, se debe trabajar un tamaño de muestra estadísticamente representativo (mínimo un $n=33$), el cual debe idealmente ser procesado en condiciones de precisión intermedia (cambio de día y/o analista) y enfocado a evaluar el cambio a evaluar.

7. PARÁMETROS A EVALUAR

7.1. Generalidades [CLSI EP 15 A3]

- Para métodos que requieren pretratamiento de las muestras antes del análisis (por ejemplo, adsorción, dilución, etc.), se debe asegurar que cada réplica se someta a todos los pasos, es decir, el preprocesamiento, así como el análisis posterior.
- Las muestras deben prepararse y almacenarse para garantizar su estabilidad a lo largo del estudio. Una práctica común es hacer alícuotas y congelarlas, siempre que sea apropiado para el mensurando. Al definir el volumen y el

número de las alícuotas se debe tener en cuenta los **volúmenes muertos** y la posibilidad de que se necesiten corridas adicionales.

- Cuando el método involucre una calibración analítica, es aconsejable que cada analista participante realice dicho ajuste, con el fin de incorporar este factor de variabilidad en el estudio de las características del método.
- Para el análisis de datos se debe realizar en todos los casos una evaluación de los datos obtenidos teniendo en cuenta la eventual presencia de datos atípicos. Aunque cualquier prueba adecuada puede usarse para justificar el tratamiento de un resultado como dato atípico, el CLSI EP 15 A3 recomienda la prueba de Contraste de Grubb's. En cualquier caso se debe evaluar la exclusión de un dato por la prueba estadística, teniendo en cuenta el comportamiento típico del material de control evaluado y si el resultado práctico de su presencia afecta o no el resultado del estudio del parámetro bajo estudio.
- De manera general en las conclusiones de Informe de evaluación del método, se utiliza el término **consistencia** para declarar el cumplimiento por parte del laboratorio con las especificaciones declaradas por el fabricante,

7.2. Evaluación desde enfoque cualitativo

7.2.1. Identidad/Selectividad [AEFI/EURACHEM/CLSI EP12-A2]

Es necesario establecer que la señal producida en la etapa de medición se debe únicamente al mensurando target (anticuerpos o antígeno(s) específicos del evento de interés) y no a la presencia de algo química o físicamente similar o que surja como una coincidencia; esta es la confirmación de la identidad. La selectividad (especificidad) es atributo del método que garantiza la confiabilidad de las mediciones en presencia de interferencias. Es bastante difícil establecer que nada interfiere ya que siempre existe la posibilidad de encontrar alguna interferencia no reconocida hasta el momento. La selectividad de un método analítico se debería determinar antes de iniciar cualquier otro estudio de cualquier otro parámetro de evaluación, dado que debe conocerse en que grado la respuesta del método es únicamente proporcionada por el mensurando target. (AEFI; EURACHEM).

La presencia de interferencias puede tener distintos efectos en la determinación del mensurando, tales como:

- Imposibilitar su identificación inequívoca (falsos positivos)
- Distorsionar la respuesta del mensurando; afectan normalmente a la pendiente y ordenada de una recta de calibración analítica (AEFI).

Para la evaluación de estos parámetros se establece de manera general utilizar muestras positivas (presencia de mensurando target) y muestras que presentan algunos de los factores que pueden generar interferencia/limitaciones según lo documentado en la literatura científica relacionada con el diagnóstico del evento de interés. De igual forma como parte del ejercicio se deben incluir muestras negativas (ausencia del mensurando target) de pacientes sanos. Dentro del panel a procesar es ideal incluir, siempre que estén disponibles, materiales de referencia plenamente caracterizados, otorgando un peso significativo dentro de las muestras positivas que sean seleccionadas para el ejercicio.

Las herramientas propuestas para evaluación se alinean con criterios documentados en CLSI para realizar **comparación** del método frente a especificaciones de caracterización establecidos por otros métodos de laboratorio y corresponden a:

- Evaluación identidad: se utiliza el parámetro de porcentaje de ACUERDO POSITIVO

- Evaluación de selectividad: se utiliza el parámetro de porcentaje de ACUERDO NEGATIVO, siendo indispensable incluir muestras que presenten interferencia cuando estas estén identificadas en la bibliografía relacionada con el evento de interés.

7.2.2. Precisión

7.2.2.1. Acuerdo

En el análisis cualitativo, la variable de acuerdo corresponde al criterio de PRECISIÓN del método de ensayo y es equivalente al enfoque de repetibilidad que se maneja para los métodos cuantitativos.

En el ejercicio de evaluación, el análisis de **acuerdo** se estructura sobre la base de los resultados obtenidos al evaluar réplicas de materiales de acuerdo con el tipo de ensayo en condiciones de repetibilidad, es decir manteniendo constante el analista responsable, equipos, muestra, método y condiciones ambientales, realizados en un período de tiempo lo más corto posible.

El análisis de esta variable se fundamenta en determinar la PROBABILIDAD que los resultados obtenidos (positivos o negativos según el enfoque del método) al analizar las réplicas del material de estudio, sean equivalentes entre sí.

De manera consecutiva se van determinando las siguientes probabilidades:

- La probabilidad de obtener un resultado determinado en **una réplica**, mediante la relación entre dicho resultado y el total de muestras analizadas.
- La probabilidad que **un par** de réplicas generen resultados equivalentes, es el cuadrado de la réplica individual.
- La probabilidad que **todas** las réplicas generen un mismo resultado entre sí, es la suma de las obtenidas para resultados positivos y negativos.

El ACUERDO se calcula **promediando** las probabilidades de obtener pares con el mismo resultado y luego transformando el dato obtenido a porcentaje.

7.2.2.2. Concordancia entre analistas

En el análisis cualitativo, la variable de **concordancia** corresponde al criterio de PRECISIÓN del método de ensayo y es equivalente al enfoque de precisión intermedia que se maneja para los métodos cuantitativos.

En el ejercicio de evaluación el análisis de **concordancia entre analistas** se estructura sobre la base de los resultados obtenidos al evaluar materiales de acuerdo al tipo de ensayo en condiciones de precisión intermedia, modificando típicamente en el sistema de medición el analista responsable y/o el día de ejecución del ensayo (tiempo); en caso de modificar otros factores como equipos e incluso métodos (al tomar por ejemplo un método como referencia) se debe declarar explícitamente en el diseño experimental del ejercicio.

El análisis de esta variable se fundamenta en establecer la PROBABILIDAD que cada resultado obtenido (positivo o negativo según el enfoque del método), tenga otro(s) equivalente de todos los resultados generados por los diferentes analista(s) o en diferentes días de montaje.

De manera consecutiva se van realizando los siguientes cálculos:

- Establecer el número total de resultados con los que puede ser comparado cada dato obtenido basados en la caracterización previa del material evaluado (criterio de exactitud diagnóstica), realizando posteriormente la respectiva sumatoria.
- Establecer el número de resultados que experimentales demostraron ser equivalentes a cada dato obtenido, realizando posteriormente la sumatoria.
- Establecer la relación entre los equivalentes obtenidos experimentalmente y los que por criterio de exactitud diagnóstica deberían presentarse; es decir:

$$\frac{\sum \text{equivalencias experimentalmente obtenidas}}{\sum \text{equivalencias definidas por criterio de exactitud diagnóstica}}$$

- Transformar el dato obtenido a porcentaje.

7.2.2.3. Concordancia frente a caracterización real

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:

- 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:

RESULTADO EXPERIMENTAL MÉTODO BAJO ESTUDIO	CRITERIO DE EXACTITUD DIAGNÓSTICA MÉTODO DE REFERENCIA		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	a	b	r
Negativo	c	d	s
Total	t	u	N

Donde:

- a Número de muestras para las cuales el resultado experimental y el criterio de exactitud diagnóstica corresponden a resultados positivos
- b Número de muestras para las cuales la caracterización por criterio de exactitud diagnóstica define un resultado negativo y el método bajo estudio genera uno positivo
- c Número de muestras para las cuales la caracterización por criterio de exactitud diagnóstica define un resultado positivo y el método bajo estudio genera uno negativo
- d Número de muestras para las cuales el resultado experimental y el criterio de exactitud diagnóstica corresponden a resultados negativos
- N Total de muestras analizadas

- Calcular el índice Kappa mediante la fórmula, donde P_o la proporción de acuerdos observados y P_e la proporción de acuerdos esperados en la hipótesis de independencia entre los métodos, es decir de acuerdos por azar

$$k = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

Donde:

$$P_o = \frac{a+d}{N} \quad \text{y} \quad P_e = \frac{rt+su}{N^2}$$

- 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

Es ideal que se obtenga un índice superior a 0,60 con respecto al criterio tomado como referencia.

7.2.3. Sensibilidad, Especificidad y Veracidad estimadas [CLSI EP12-A2]

Las características de desempeño desde el punto de vista cualitativo asociadas con la veracidad, especificidad y sensibilidad estimadas pueden definirse numéricamente. Estas se relacionan con las proporciones relativas de muestras que se supone son positivas o negativas obtenidas en la aplicación de la prueba bajo estudio, comparada con la verdadera caracterización (criterio de exactitud diagnóstica) de la muestra utilizada.

Después de haber realizado n ensayos, sus resultados se dividen en cuatro categorías:

- Número de muestras positivas, caracterizadas como tal, VERDADEROS POSITIVOS (VP)
- Número de muestras positivas, caracterizadas como negativas, FALSOS NEGATIVOS (FN)
- Número de muestras negativas, caracterizadas como tal, VERDADEROS NEGATIVOS (VN)
- Número de muestras negativas, caracterizadas como positivas, FALSOS POSITIVOS (FP)

La caracterización de las muestras como POSITIVAS corresponderá a aquella que **contiene el mensurando de interés** y NEGATIVA, la que **no lo contiene**. Estas frecuencias se expresan en una tabla de 2 x 2 o tabla de contingencia, la cual permite caracterizar el sistema fundamentado en el concepto de probabilidad, diferenciando las muestras en respuestas binarias (positivo/negativo – reactivo/no reactivo) y estableciendo una comparación respecto al resultado obtenido mediante un método de referencia, confirmatorio o una caracterización incuestionable.

Resultado obtenido al aplicar el método	Caracterización real de la muestra	
	Positivo (+)	Negativo (-)
Presunto resultado (+)	VP	FP
Presunto resultado (-)	FN	VN

Posteriormente se calculan los siguientes parámetros:

N = Número total de muestras (VP+VN+FP+FN)

N_- = Número de resultados caracterizados previamente como negativos (VN+FP)

N_+ = Número de resultados caracterizados previamente como positivos (VP+FN)

A partir de esta información, se calculan los porcentajes de exactitud, especificidad y sensibilidad así:

Veracidad (índice de validez/proporción de aciertos) $(VP+VN/N) * 100$

Fracción de positivos y negativos asignados correctamente

Sensibilidad estimada $(VP/N_+) * 100$

Fracción de los positivos totales correctamente asignada en el presunto resultado

Especificidad estimada $(VN/N_-) * 100$

Fracción de los negativos totales correctamente asignados en el presunto resultado

Tasa de falsos positivos $FP / (VN+FP)$

Fracción de los positivos observados, asignados erróneamente

Tasa de falsos negativos $FN / (VP+FN)$

Fracción de los negativos observados, asignados erróneamente

Para la sensibilidad y la especificidad se deben calcular los respectivos límites de confianza. Como criterio se adopta el esquema planteado por el CLSI (1), el cual calcula los intervalos a un 95% de confianza de acuerdo con las siguientes fórmulas y tomando los datos registrados en la tabla de contingencia de 2 x 2 obtenido en el ejercicio experimental:

Sensibilidad (Se)

$$\left[100 \times \frac{Q1_{Se} - Q2_{Se}}{Q3_{Se}}, 100 \times \frac{Q1_{Se} + Q2_{Se}}{Q3_{Se}} \right]$$

Donde:

$$Q1_{Se} = 2 * VP + 3,84$$

$$Q2_{Se} = 1,96 \sqrt{(3,84 + 4) * VP * \frac{FN}{VP+FN}}$$

$$Q3_{Se} = 2(VP+FN) + 7,68$$

Especificidad (Sp)

$$\left[100 \times \frac{Q1_{Sp} - Q2_{Sp}}{Q3_{Sp}}, 100 \times \frac{Q1_{Sp} + Q2_{Sp}}{Q3_{Sp}} \right]$$

Donde:

$$Q1_{Sp} = 2 * VN + 3,84$$

$$Q2_{Se} = 1,96 \sqrt{(3,84 + 4) * FP * \frac{VN}{FP+VN}}$$

$$Q3_{Se} = 2(FP+VN) + 7,68$$

7.3. Evaluación desde enfoque cuantitativo

7.3.1. Evaluación de estabilidad de la muestra [AEFI – Parte IV]

Dado que la estabilidad del mensurando tiene influencia directa los parámetros que se estudian durante la evaluación del método, cuando se considere necesario demostrar la estabilidad de las muestras allegadas para estudio, controles y/o materiales de referencia, se pueden evaluar los siguientes aspectos según se determine:

- Tiempo de transporte al laboratorio y condiciones de temperatura durante dicho período
- Tiempo y condiciones de almacenamiento en el laboratorio
- Efectos de congelación-descongelación de muestras
- Tiempo comprendido entre la preparación/reconstitución de controles o materiales de referencia y la finalización del análisis, especialmente en aquellos métodos en los cuales permanecen por períodos prolongados de tiempo para ser utilizados o analizados.

Es importante destacar que el estudio de estabilidad debe situarse de forma racional, dentro de lo que se considera la práctica real y la rutina de análisis del laboratorio o del transporte de las muestras, por lo cual, no será necesario establecer la estabilidad en un plazo que exceda el tiempo definido según la naturaleza del ensayo, muestra, control o material de referencia.

De manera general, el ejercicio se puede desarrollar mediante corrida de tres alícuotas del material idealmente de concentraciones alta, media y baja (cuando aplique y de acuerdo con viabilidad respecto a las concentraciones típicas del mensurando en las muestras rutinarias) y en todos los casos dentro del rango de aplicación del método, en las situaciones que se definan van a ser evaluadas. Las particularidades en concentraciones y tiempos de análisis o almacenamiento deben establecerse desde el diseño experimental y detallarse en el respectivo Informe de evaluación del método.

La metodología se fundamenta en mediciones iniciales del mensurando (basales) y mediciones posteriores luego de almacenamiento en condiciones controladas, durante un período de tiempo relevante según los lineamientos del método analítico y las propiedades del mensurando. La estabilidad se determinará por comparación de los datos basales y la respuesta obtenida luego del almacenamiento mediante herramientas como:

- Porcentaje de recuperación frente a la concentración basal: Se puede establecer mediante un criterio estadístico que demuestre si existe o no existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100%.
- Comparación de medias: Utilizando herramientas estadísticas tales como un análisis ANOVA.

En caso de que se evidencia incumplimiento frente al criterio establecido, se deben analizar, revisar y ajustar los factores que se establezca, están influyendo en la estabilidad de la muestra, control y/o materiales de referencia.

7.3.2. Efecto matriz [CLSI EP14-A3]

Para ensayos de ELISA puede ser necesario valorar si existe o no efecto matriz al aplicar el método sobre diferentes matrices, para lo cual la metodología recomendada por CLSI define que:

- Se debe procesar un n mínimo de veinte (20) muestras, idealmente frescas, aunque también es válido trabajar con muestras congeladas. La concentración de dichas muestras debe cubrir en lo posible el rango de medición aplicable y para el análisis se deben organizar de manera ascendente en cuanto al resultado de absorbancia.
- Usando el método de ensayo a evaluar analizar las muestras al menos por triplicado, en una misma corrida analítica, trabajando para el análisis la media de dichas réplicas.
- Se deben analizar simultáneamente las matrices objeto de estudio. Si no puede realizar el análisis simultáneo, se debe demostrar que el almacenamiento de las muestras y las condiciones de ejecución del ensayo no afectan significativamente el resultado.

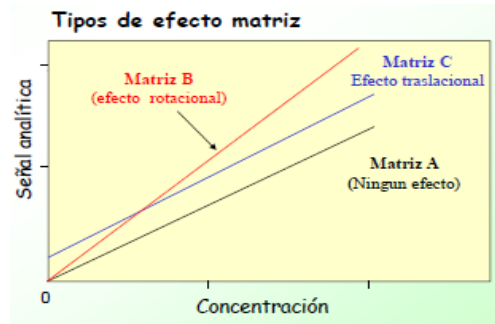
El análisis de los datos debe ser realizado mediante las siguientes herramientas aplicadas secuencialmente:

Primera evaluación: Método regresión lineal

- Tabular los resultados y aplicar una evaluación de datos atípicos, aplicando el criterio técnico para su descarte de los datos que van a ser objeto de análisis; esto se debe realizar mediante una herramienta como Contraste de Dixon para los datos generados por muestra analizada.
- Graficar la media de los resultados de las muestras obtenidas en la matriz A (eje X) y la matriz B (eje Y) y calcular la pendiente y el intercepto para la evaluación inicial.
- Verificar que los datos se adaptan al modelo lineal. Evaluar la presencia de efectos matriz, los cuales pueden clasificarse de acuerdo con su naturaleza en:
 - Aditivos: Se refieren a un desplazamiento positivo del cero en presencia de la matriz
 - Multiplicativos se refieren a un cambio de la pendiente, y a su vez pueden clasificarse en:

Efecto traslacional (constante): Surge de las señales analíticas producidas por otras sustancias presentes en la muestra. Es independiente de la concentración del mensurando. Afecta el intercepto, pero no la pendiente. (background).

Efecto rotacional (proporcional) surge cuando la señal del mensurando es afectada por otras sustancias presentes en la muestra. La magnitud de este efecto es proporcional a la señal analítica. Afecta la pendiente pero no el intercepto (efecto matriz).



Fuente: FAO 2013

Segunda evaluación: Método de distribución de medias vs diferencias

- Examinar la dispersión de los resultados graficando la diferencia de los datos obtenidos en para la matriz A y B (eje Y) frente a los promedios de los datos obtenidos en las dos matrices (eje X); esto para cada muestra procesada.
- Examinar el comportamiento de los datos; típicamente debe observarse que NO hay un patrón específico de dispersión.
- En caso de observar que las diferencias aumentan en proporción a la concentración de analito, realizar una transformación logarítmica de los datos y repetir la mecánica de graficado.

De las evaluaciones realizadas se concluye que NO hay efecto matriz estadísticamente significativo si se cumplen los siguientes criterios:

- Los datos graficados muestran una relación lineal.
- Los datos obtenidos en la gráfica de distribución de medias vs diferencias muestran un patrón aleatorio, es decir los datos se ubican a la lado y lado de la línea media.

7.3.3. Límite del blanco [CLSI EP17 A2]

Para la evaluación del límite del blanco se toman los datos correspondientes a las muestras blanco es decir las clasificadas como negativas por criterio de exactitud diagnostica (no contienen el mensurando target) del panel definido para el ejercicio, realizando la secuencia de análisis que se detalla a continuación en el marco de aplicación de opción paramétrica:

MEDIA DE MUESTRAS BLANCO	M_B
DESVIACIÓN ESTÁNDAR de B	SD_B
Factor que da el percentil 95 de una distribución normal, corregido para el uso de la estimación de la desviación estándar observada	C_p
Total de datos obtenidos	B
Total de muestras analizadas	K

- Se calcula la media (**M_B**) de los datos generados por las muestras blanco (negativas)
- Se calcula la desviación estándar (**SD_B**) de los datos generados por las muestras blanco (negativas)
- Se calcula el percentil C_p de los datos mediante la siguiente fórmula:

$$C_p = \frac{1,645}{1 - \left\{ \frac{1}{4(B-K)} \right\}}$$

El factor 1,645 representa el percentil 95 de una distribución normal con un $\alpha = 0,05$

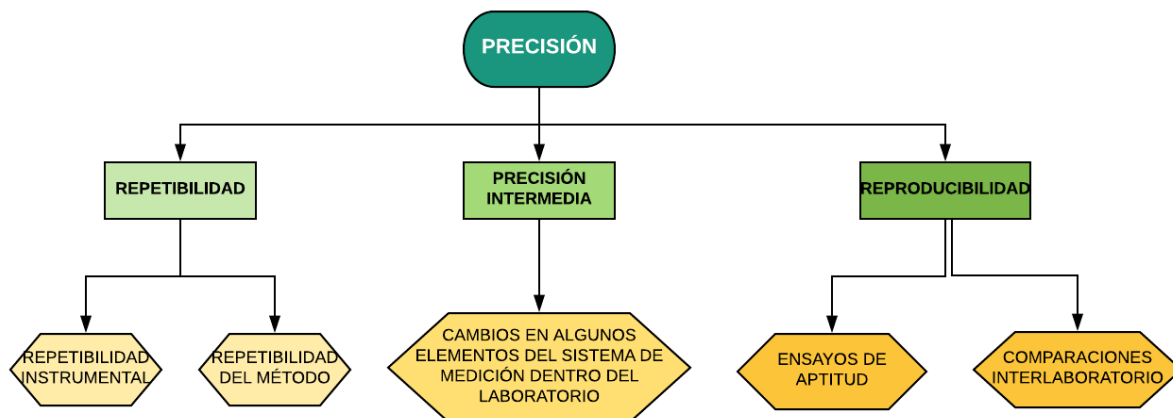
El término (B-K) representa los grados de libertad para la estimación de la desviación estándar de las muestras blanco

- Se calcula el Límite del Blanco aplicando la siguiente fórmula:

$$LoB = M_B + (C_p * SD_B)$$

7.3.4. Precisión

En el diagrama que se presenta a continuación se definen las variables asociadas a la evaluación del parámetro de precisión; como parte del ejercicio de verificación de los métodos en el LSP se valoran la repetibilidad del método y la precisión intermedia.



A continuación, se presentan aspectos generales a tener en cuenta en la evaluación:

- El material provisto (MR/MR/MQC/muestras rutinarias) para realizar la evaluación de precisión debe incluir una cantidad adicional para prever situaciones como derrames, errores crasos en la obtención del resultado, etc. La cantidad de material preparado debe ser suficiente para ejecutar el ensayo y dejar una cantidad adecuada de reserva. [ISO 5725-2]
- Cuando un material debe ser homogenizado, esto debe hacerse de la manera apropiada de acuerdo con lo establecido en el respectivo método de ensayo. [ISO 5725-2]
- La precisión es generalmente dependiente de la concentración de analito (mensurando), y así debe determinarse en una serie de concentraciones a través del intervalo de interés. Si procede, la relación entre la precisión y la concentración de analito (mensurando) debe estar establecida. [EURACHEM]

7.3.4.1. Repetibilidad del método (Precisión intra-corrida)

El ensayo de repetibilidad del método se realiza sobre una serie de alícuotas, de una muestra homogénea que se analiza independientemente desde el principio (preparación de la muestra) hasta el final (lectura de resultados) **en condiciones de repetibilidad**. A continuación, se presentan las opciones de estadísticos para estimar este parámetro:

Coefficiente de variación (CV) [CLSI EP 15 A3]

- Se calcula matemáticamente mediante la siguiente fórmula:

$$\%CV = \frac{s}{\bar{x}} * 100$$

Donde s corresponde a la desviación estándar y \bar{x} es la media calculada en el ejercicio de precisión.

Rango (R) [IUPAC Gold Book 2014]:

- En coherencia con los criterios documentados este documento que declaran el concepto de repetibilidad en algunos contextos como “La repetibilidad puede definirse como la valor por debajo del cual la diferencia absoluta entre dos resultados de ensayo individuales obtenidos en las condiciones descritas, puede esperarse que se encuentren con una probabilidad especificada”, para esta aplicación particular corresponde al valor absoluto de la diferencia entre los resultados de absorbancia obtenidos de las réplicas procesadas en condiciones de repetibilidad.
- Se calcula matemáticamente como el valor absoluto de la diferencia del valor máximo de absorbancia menos el valor mínimo obtenido para las réplicas procesadas:

$$R_{muestra} = ABS(Absorbancia_{m\acute{a}xima} - Absorbancia_{m\acute{i}nima})$$

Para efectos del análisis se puede optar por alguna de las siguientes estrategias para determinar la repetibilidad:

- **Repetibilidad agrupada no ponderada [GTC 84]:** se realiza el cálculo agrupado no ponderado de la repetibilidad del laboratorio (donde A,B...n son los analistas autorizados para el ensayo), aplicando la siguiente fórmula:

$$\sqrt{\frac{s_A^2 + s_B^2 + \dots + s_X^2}{n}}$$

Donde:

$s_{A...X}^2$ Repetibilidad de cada analista
n Número de datos

- **Desviación estándar intra-corrída [CLSI EP15 A2]:** se realiza la determinación de la repetibilidad mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum_{d=1}^D \sum_{r=1}^n (X_{dr} - \bar{X}_d)^2}{D(n-1)}}$$

Donde:

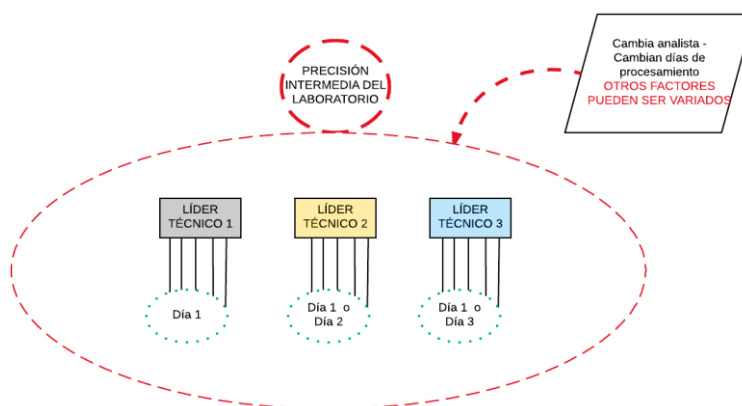
D = Número total de días/ analista(s)
n = Número total de réplicas por día/ analista(s)
X_{dr} = Resultado por cada réplica en el día/analista(s)
X_d = Promedio de todas las réplicas en el día/analista(s)

7.3.4.2. Precisión Intermedia

El objetivo del estudio de precisión intermedia es determinar la variabilidad del método, efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, en un mismo laboratorio, pero en condiciones operativas diferentes. Típicos factores para estudiar incluyen cambios en el día de procesamiento y el analista, sin embargo, otros pueden ser incluidos de acuerdo con los requerimientos de operatividad en la ejecución del método.

No es necesario estudiar cada uno de estos factores individualmente, sino que es suficiente comprobar que la variabilidad aportada por el conjunto de factores está dentro de los límites establecidos. Para este estudio las muestras deben ser preparadas independientemente y analizarse como mínimo por duplicado.

A continuación, se plasma un ejemplo para el diseño experimental:



La estimación de la precisión intermedia se puede realizar mediante herramientas tales como:

- Cálculo del porcentaje de coeficiente de variación (o su equivalente desviación estándar relativa) global de las respuestas obtenidas, es decir, considerando cada resultado independientemente. [AEFI]
- **Desviación estándar inter-corrída [CLSI EP15 A2]:** la estimación de la precisión intermedia involucra los siguientes pasos:
 - Primer paso: determinar la desviación estándar de la repetibilidad de acuerdo a lo detallado en el ítem anterior:

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum_{d=1}^D \sum_{r=1}^n (X_{dr} - \bar{X}_d)^2}{D(n-1)}}$$

- Segundo paso: calcular la varianza de los promedios diarios (S_b^2) utilizando la siguiente ecuación:

$$s_b^2 = \frac{\sum_{d=1}^D (\bar{X}_d - \bar{\bar{X}})^2}{D-1}$$

Donde:

- D Número total de días/analista(s)
- \bar{X}_d Promedio de todas las réplicas en el día.
- $\bar{\bar{X}}$ Promedio de todos los resultados.

- Tercer paso: calcular la precisión intermedia (intralaboratorio) utilizando la siguiente ecuación:

$$S_{intermedia} = \sqrt{\frac{n-1}{n} * s_r + s_b^2}$$

Donde:

n Número réplicas por día

- Utilizando un ANOVA de un factor, en donde la precisión intermedia se obtiene como la raíz cuadrada de la suma de cuadrados de la precisión dentro del grupo y entre grupos [CLSI EP 15 A3 - EURACHEM].

La metodología propuesta utiliza el análisis de ANOVA como información base, entendida como una herramienta que proporciona una estimación de la variabilidad total del conjunto de datos para una muestra dentro del grupo y entre grupos. En el contexto de este tipo de ejercicios la variabilidad dentro de grupo corresponde a la condición de repetibilidad y "entre grupos" corresponde a condiciones de precisión intermedia en donde es viable cambiar factores como analista, día de corrida, etc.; es decir, entre corridas. Para la estimación se trabaja a partir de la siguiente tabla que se obtiene al aplicar la prueba de ANOVA de un factor:

Origen de las variaciones	SS (Suma de cuadrados)	v (Grados de libertad)	MS (Promedio de los cuadrados)
Entre grupos	SS _b	p-1	MS _b
Dentro de los grupos	SS _w	N-p	MS _w
Total	SS _{total}	N-1	

Fuente: EURACHEM 2014

Realizar los cálculos siguiendo los pasos que se detallan a continuación:

- La desviación estándar de la repetibilidad s_r , se obtiene calculando la raíz cuadrada del término del cuadrado medio dentro del grupo, que representa la varianza intra-grupo:

$$s_r = \sqrt{MS_w}$$

- La contribución a la variación total del factor de agrupamiento (si) también se obtiene a partir de la tabla ANOVA:

$$s_w = \sqrt{\frac{MS_b - MS_w}{n}}$$

- La precisión intermedia puede, en consecuencia, calcularse combinando los componentes de la varianza intra-grupo y entre grupos, descritos anteriormente:

$$S_I(\text{intermedia}) = \sqrt{s_r^2 + s_w^2}$$

- Para efectos de incorporar la precisión intermedia como fuente de incertidumbre, esta debe ser expresada como la desviación estándar de la media, aplicando la siguiente fórmula [EURACHEM]:

$$s_{\bar{x}} = \frac{S_I}{\sqrt{n}}$$

7.3.4.3. Criterios de aceptación

Para verificar la consistencia de las estimaciones de precisión del laboratorio con las especificaciones definidas por el fabricante, es necesario tener en cuenta las condiciones que fueron utilizadas en el estudio de validación primaria de precisión, tales como niveles de concentración del mensurando target, número de muestras, número de réplicas, etc. A efectos prácticos, no puede esperarse que la media de las concentraciones medidas en el estudio del laboratorio coincida exactamente con las declaradas por el fabricante.

De manera general los % CV tabulados para la media más cercana a una muestra puede ser adoptada razonablemente como la especificación del fabricante en esa concentración. Sin embargo, a menudo puede ser más apropiado para determinar las especificaciones, utilizar estrategias de interpolación o promedio de las estadísticas tabuladas en el inserto del fabricante para niveles de concentración cercanos al nivel evaluado [CLSI EP 15 A3].

- Se evalúa la consistencia de la estimación de repetibilidad en términos de %CV y rango de cada analista (A, B...X) frente al criterio de precisión establecido por el fabricante para cada tipo de resultado categórico obtenido (positivo/negativo o reactivo/no reactivo).
- En caso de no contar con esta información, se define experimentalmente, teniendo en cuenta que el máximo de %CV idealmente debe corresponder al 20% para muestras positivas [CLSI EP17-A2].
- Si la estimación de precisión obtenida en el laboratorio no excede la especificación del fabricante correspondiente, se puede emitir cumplimiento con el criterio de consistencia de manera directa. En caso contrario, se debe llevar a cabo una segunda parte de la verificación de consistencia y comparar la estimación obtenida con el Límite superior de especificación (UVL por sus siglas en inglés) correspondiente para la especificación declarada. [CLSI EP 15 A3]. **Esta opción es viable siempre y cuando el fabricante haya desarrollado un ejercicio de validación de precisión con el esquema mínimo de 5 réplicas por 5 días de corrida:**
 - Determinar los grados de libertad del ejercicio así:
 - **Para comparación de repetibilidad:** calcular directamente como $df_r = N - k$, donde N es el número total de resultados y k es el número de corridas.

- **Para comparación de precisión intermedia:** calcular el radio ρ a un promedio de concentración dada así:

$$\rho = \frac{\%CV_{wl}}{\%CV_r}$$

Donde: CV_{wl} es la precisión intermedia y CV_r es la repetibilidad.

- Determinar los grados de libertad aproximados, df_{wl} utilizando los datos de la Tabla 6 (CLSI EP15 A3) para encontrar el valor de ρ que más se aproxima al calculado y luego leer el valor df_{wl} asociado.
- Usando los grados de libertad asociados a la evaluación de repetibilidad $df = df_r$ o precisión intermedia $df = df_{wl}$, según corresponda, determinar el factor F de la Tabla 7 del documento CLSI EP15 A3 (Ver Tabla 2) en la entrada correspondiente a la intersección de los grados de libertad df con el número total de muestras de prueba utilizadas en el estudio completo de verificación de precisión.
- Calcular el UVL como el factor F (extraído de la Tabla 7 CLSI EP15 A3) multiplicado por la especificación asociada: **$UVL = F \cdot \%CV$** .
- Comparar la estimación de precisión obtenida en el laboratorio con el UVL para evaluar la respectiva consistencia.

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

5 Runs		6 Runs		7 Runs	
ρ	df_{WL}	ρ	df_{WL}	ρ	df_{WL}
2.74	5	3.02	6	3.27	7
2.06	6	2.25	7	2.42	8
1.78	7	1.93	8	2.06	9
1.62	8	1.74	9	1.85	10
1.51	9	1.62	10	1.71	11
1.43	10	1.52	11	1.61	12
1.37	11	1.46	12	1.54	13
1.32	12	1.40	13	1.48	14
1.28	13	1.35	14	1.42	15
1.24	14	1.32	15	1.38	16
1.21	15	1.28	16	1.35	17
1.19	16	1.25	17	1.31	18
1.16	17	1.23	18	1.29	19
1.14	18	1.20	19	1.26	20
1.12	19	1.18	20	1.24	21
1.10	20	1.16	21	1.22	22
1.08	21	1.14	22	1.20	23
1.05	22	1.12	23	1.18	24
1.03	23	1.11	24	1.16	25
1.00	24	1.09	25	1.14	26
		1.07	26	1.13	27
		1.05	27	1.11	28
		1.03	28	1.10	29
		1.00	29	1.08	30
				1.07	31
				1.05	32
				1.03	33
				1.00	34

Abbreviations: σ_R , manufacturer's claim for repeatability; σ_{WL} , manufacturer's claim for within-laboratory imprecision; df_{WL} , degrees of freedom for within-laboratory imprecision.

Fuente: CLSI EP15 A3

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

<i>DF</i>	Number of Samples					
	1	2	3	4	5	6
5	1.49	1.60	1.66	1.71	1.74	1.76
6	1.45	1.55	1.61	1.65	1.67	1.70
7	1.42	1.51	1.56	1.60	1.62	1.65
8	1.39	1.48	1.53	1.56	1.58	1.60
9	1.37	1.45	1.50	1.53	1.55	1.57
10	1.35	1.43	1.47	1.50	1.52	1.54
11	1.34	1.41	1.45	1.48	1.50	1.52
12	1.32	1.39	1.43	1.46	1.48	1.49
13	1.31	1.38	1.42	1.44	1.46	1.47
14	1.30	1.37	1.40	1.42	1.44	1.46
15	1.29	1.35	1.39	1.41	1.43	1.44
16	1.28	1.34	1.38	1.40	1.41	1.43
17	1.27	1.33	1.36	1.39	1.40	1.41
18	1.27	1.32	1.35	1.37	1.39	1.40
19	1.26	1.31	1.34	1.36	1.38	1.39
20	1.25	1.31	1.34	1.36	1.37	1.38
21	1.25	1.30	1.33	1.35	1.36	1.37
22	1.24	1.29	1.32	1.34	1.35	1.36
23	1.24	1.29	1.31	1.33	1.35	1.36
24	1.23	1.28	1.31	1.32	1.34	1.35
25	1.23	1.28	1.30	1.32	1.33	1.34
26	1.22	1.27	1.30	1.31	1.32	1.34
27	1.22	1.26	1.29	1.31	1.32	1.33
28	1.22	1.26	1.28	1.30	1.31	1.32
29	1.21	1.26	1.28	1.30	1.31	1.32
30	1.21	1.25	1.27	1.29	1.30	1.31
31	1.20	1.25	1.27	1.29	1.30	1.31
32	1.20	1.24	1.27	1.28	1.29	1.30
33	1.20	1.24	1.26	1.28	1.29	1.30
34	1.20	1.24	1.26	1.27	1.28	1.29

Abbreviations: *DF*, degrees of freedom; UVL, upper verification limit.

Fuente: CLSI EP15 A3

7.3.4.4. Intervalos de confianza de la precisión [AEFI]

Es opcional introducir los intervalos de confianza en el estudio de la precisión. Estos intervalos deben determinarse para cada nivel de concentración estudiado.

Cuando el número de muestras es pequeño (inferior o igual a 30), las medidas independientes y la distribución normal, pueden calcularse de acuerdo con la distribución t de Student según:

- Para resultados individuales

$$\bar{x} \pm t_{v,\alpha} * s$$

- Para resultados obtenidos de n réplicas

$$\bar{x} \pm t_{v,\alpha} * \frac{s}{\sqrt{n}}$$

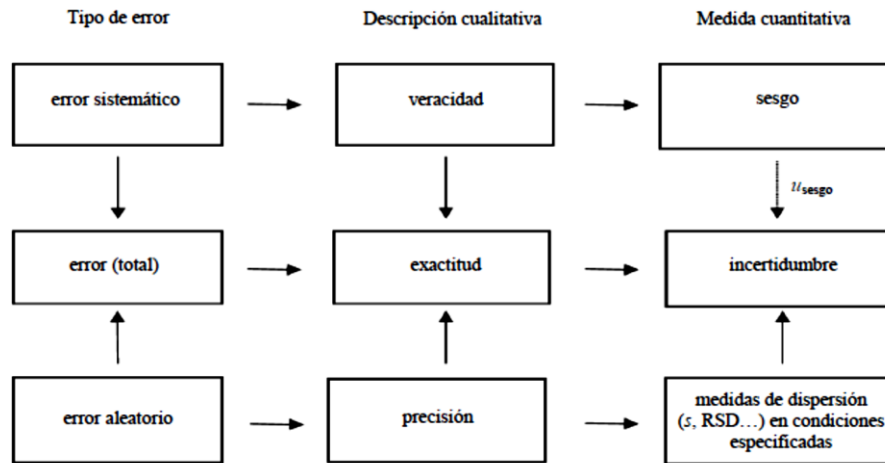
Donde:

- s Desviación estándar (repetibilidad o precisión intermedia)
- $t_{v,\alpha}$ Es el valor de t de Student tabulado para n mediciones con v= n-1 grados de libertad y para varios niveles de significación (el nivel más usado es de $\alpha= 0.05$, que corresponde a un nivel de confianza del 95%)
- n Número de réplicas procesadas

Generalmente se aceptan valores de precisión intermedia, inferiores al doble de la repetibilidad del método. En caso de que no se cumpla, es necesario evaluar cuál es el factor responsable de esta variabilidad. [AEFI]

7.3.5. Veracidad

Tres características de desempeño relacionadas, veracidad, precisión e incertidumbre son utilizadas para describir la calidad de los resultados obtenidos con un método [EURCAHEM]. Por tanto, el concepto de exactitud en coherencia con la definición establecida en el VIM corresponde a la suma de precisión y veracidad de un resultado. A continuación, se ilustra la relación de los citados conceptos con el fin de abordar la evaluación de veracidad con la claridad técnica requerida:



Fuente: EURACHEM

La evaluación de veracidad en el campo cuantitativo para los ensayos de ELISA se puede realizar desde dos criterios:

- Cumplimiento de los resultados obtenidos a partir de los controles de los estuches comerciales frente al criterio establecido por el método del fabricante. En este caso la herramienta para evaluación corresponde a la carta control del material de control relacionado, la cual además de evaluar el comportamiento frente al límite del fabricante.
- En el caso de que el fabricante defina rangos de especificación para el material de control de los estuches, se puede evaluar la veracidad en términos de sesgo frente al punto medio del rango establecido.

7.3.6. Comparación de métodos [CLSI EP12 A2]

En algunos casos el laboratorio puede requerir realizar un abordaje de comparación de las especificaciones obtenidas en la evaluación de un método de ensayo, utilizando un método de referencia u otro método suficientemente estudiado o de mayor jerarquía. En estos casos, la comparación se desarrolla con un enfoque cualitativo, utilizando las siguientes herramientas para el análisis:

El esquema CLSI permite evaluar el acuerdo (precisión en términos de concordancia) entre los dos métodos bajo estudio; sin embargo, es importante tener en cuenta que con esta herramienta no es posible analizar la veracidad (resultados correctos, es decir, concordantes con la caracterización real).

- Construir la tabla de contingencia de 2 x 2 con los resultados obtenidos por el método tomado como referencia y la prueba rápida

Prueba rápida	Método tomado como referencia		Total
	Positivo (+)	Negativo (-)	
Positivo (+)	a	b	a+b
Negativo (-)	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	N

- Calcular el porcentaje de acuerdo mediante la siguiente fórmula: este indicador presenta una evaluación del acuerdo general entre los resultados obtenidos por la prueba rápida y el método tomado como referencia mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de acuerdo total} = 100 * \frac{(a+d)}{N}$$

- Calcular el porcentaje de acuerdo positivo y negativo: permite evaluar independientemente el comportamiento de la prueba rápida/método tomado como referencia correspondiente a las muestras positivas y negativas mediante la aplicación de las siguientes fórmulas:

$$\text{Porcentaje de acuerdo positivo (PAP)} = 100 * \frac{(a)}{a+c}$$

y

$$\text{Porcentaje de acuerdo negativo (PAN)} = 100 * \frac{(d)}{b+d}$$

- Establecer los intervalos de confianza de los porcentajes de acuerdo calculados: para cada parámetro evaluado se aplican las fórmulas detalladas a continuación:

Porcentaje de acuerdo total a un 95% de confianza

$$\left[100 * \frac{Q1 - Q2}{Q3}, 100 * \frac{Q1 + Q2}{Q3} \right]$$

Donde:

$$Q1 = 2(a+d) + 3,84$$

$$Q2 = 1,96 \sqrt{3,84 + 4(a+d) * \frac{b+c}{N}}$$

$$Q3 = 2N + 7,68$$

Porcentaje de acuerdo positivo (PAP) a un 95% de confianza

$$\left[100 * \frac{Q1_{PAP} - Q2_{PAP}}{Q3_{PAP}}, 100 * \frac{Q1_{PAP} + Q2_{PAP}}{Q3_{PAP}} \right]$$

Donde:

$$Q1_{PAP} = 2a + 3,84$$

$$Q2_{PAP} = 1,96 \sqrt{3,84 + \frac{4ac}{(a+c)}}$$

$$Q3_{PAP} = 2(a+c) + 7,68$$

Porcentaje de acuerdo negativo (PAN) a un 95% de confianza

$$\left[100 \times \frac{Q1_{PAN} - Q2_{PAN}}{Q3_{PAN}}, 100 \times \frac{Q1_{PAN} + Q2_{PAN}}{Q3_{PAN}} \right]$$

Donde:

$$Q1_{PAN} = 2d + 3,84$$

$$Q2_{PAN} = 1,96 \sqrt{3,84 + \frac{4bd}{(b+d)}}$$

$$Q3_{PAN} = 2(b+d) + 7,68$$

7.3.7. Revaluación del método

Para el caso de los métodos ELISA, la revaluación del método requiere repetir el ejercicio desarrollado inicialmente, realizando el abordaje de acuerdo con el factor a evaluar así:

- **Paso del tiempo.** El ejercicio debe ser realizado como máximo con periodicidad bianual y se puede abordar mediante las siguientes estrategias:
 - Revaluación con información histórica del desempeño del método: consiste en consolidar datos obtenidos en el marco de actividades de evaluación del desempeño del personal / control de calidad analítico, para desarrollar nuevamente el análisis de datos, aplicando las herramientas estadísticas pertinentes y emitir una actualización del informe de evaluación del método que dé cuenta del mantenimiento de las características de desempeño del mismo.
 - Revaluación prospectiva: consiste en desarrollar una evaluación prospectiva, con abordaje de los parámetros de precisión y veracidad del método. El análisis de los datos debe realizarse desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo. Se sugiere trabajar un tamaño de muestra n calculado mediante la herramienta estadística para estimación de una media (ver Anexo 01 del LINEAMIENTO TÉCNICO PARA LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA ESTRATEGIAS PARA LA CONSTRUCCIÓN DE DISEÑOS EXPERIMENTALES DE VALIDACIÓN - VERSIÓN 01)
- **Cambios a un método que ya ha sido evaluado.** La inclusión de un cambio al método del fabricante debe ser abordado como un ejercicio integral de evaluación del método, según los criterios declarados en el presente documento.

- **Cambios fundamentales en infraestructura física.** Dada la naturaleza del ensayo y siempre que sea posible asegurar el cumplimiento de las condiciones ambientales (en especial de temperatura ambiente) para la ejecución del ensayo y óptimo funcionamiento de equipos, es válido que el ejercicio de reevaluación se realice de manera equivalente al planteado para el paso del tiempo.
- **Cambios realizados por el organismo que publicó el método de ensayo:** en este caso la evaluación del método se debe repetir con la extensión necesaria de acuerdo con el impacto del cambio.

8. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

- (1) CLINICAL & LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLSI EP14-A3 - Evaluation of Commutability of Processed Samples. Third edition, 2014.
- (2) ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE FARMACÉUTICOS DE LA INDUSTRIA – AEFI. Validación de métodos analíticos. Barcelona, 2001.
- (3) INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO 5725-2:1994. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.
- (4) B. MAGNUSSON Y U. ÖRNEMARK (eds.) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0. Disponible en www.eurachem.org
- (5) CLINICAL & LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLSI EP 12-A2 - User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline. “a. Edition, 2008.
- (6) CLINICAL & LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLSI EP 17 A2 - Evaluation of Detection Capability for clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline. 2a. Edition, 2012.
- (7) CLINICAL & LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLSI EP 15 A3 - User Verification of Precision and Estimation of Bias; Approved Guideline—Third Edition, 2014.
- (8) EUROLAB. Cuantificación de la Incertidumbre en Medidas Analíticas. Primera edición española, 2012. Disponible en http://www.citac.cc/QUAM2012_P1_ES.pdf

9. DOCUMENTOS DE APOYO

- CLINICAL & LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLSI EP 15 A3 - User Verification of Precision and Estimation of Bias; Approved Guideline—2th Edition, 2005.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO 16140-1:2016. Microbiology of the food chain -- Method validation -- Part 1: Vocabulary

- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO 17511:2003. In vitro diagnostic medical devices - Measurement of quantities in biological samples -- Metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO 3534-1:2006. Statistics -- Vocabulary and symbols -- Part 1: General statistical terms and terms used in probability
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO 5725-2:1994. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.
- INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN – ICONTEC. GTC 84:2003 Calidad del agua. Guía para la orientación acerca de la validación de métodos de análisis microbiológicos
- LANDIS JR, KOCH GG. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics. 1977; 33(1):159-74.
- ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA (FAO), NATIONAL FOOD ADMINISTRATION Science Department – Swedish National Food Agency, SISTEMA INTEGRADO DE LABORATORIOS DE ALIMENTOS (SILA). Curso-Taller: "La Confiabilidad de los Resultados Analíticos para la Calidad e Inocuidad de los Alimentos (Validación, Incertidumbre y Trazabilidad). Validación IV (en línea) <http://sila.achipia.gob.cl/repositorio/curso-taller-la-confiabilidad-de-los-resultados-analiticos-para-la-calidad-e-inocuidad> (consultado en 2017-11)