

CRITERIOS ORIENTATIVOS PARA CONSTRUCCIÓN DE CARTAS DE CONTROL POR VARIABLES EN ENSAYOS POR TÉCNICAS DE ELISA Y MICROBIOLÓGICOS CUANTITATIVOS

Jeannette C. Forero H., Diana P. Martínez H, Ángela Coronado C.
Instituto Nacional de Salud – Subdirección de Gestión de Calidad LSP
Calle 26 No. 51-20 Bogotá D.C. Colombia
2207700 Ext 1550
acoronado@ins.gov.co

Resumen: las cartas de control por variables han sido empleadas rutinariamente en la industria como herramienta para el control de los procesos. Dichas herramientas fueron incorporadas al laboratorio de ensayo como una representación gráfica del comportamiento del control de calidad analítico; sin embargo, aunque su aplicabilidad se ha desarrollado ampliamente en el campo del análisis fisicoquímico, el uso de las mismas para ensayos de otra naturaleza tales como ensayos inmunoquímicos y microbiológicos ha sido limitado. Este artículo presenta enfoques alternativos de aplicación, proponiendo una estrategia de “carta a la medida” fundamentado en las características particulares de cada método de ensayo.

Palabras claves: cartas de control, control de calidad, ensayos de ELISA, ensayos microbiológicos cuantitativos, precisión, exactitud.

Abstract: the control charts by variables have been used routine in the industry as tool for the control of the processes. These tools were incorporated into the Testing Laboratory as a graphical representation of the behavior of the analytical quality control; nevertheless, though its applicability has developed widely in the physicochemical analysis, the use of the same ones for assays of another nature like ELISA and microbiological test it has been limited. This article presents alternative approaches of application, proposing a strategy of "letter made to measure" based on the particular characteristics of every testing method.

Keywords: control charts, quality control, ELISA assay, quantitative microbiological assay, precision, accuracy.

1. INTRODUCCIÓN

La importancia de fortalecer el uso de cartas de control para ensayos cuyos resultados tienen un comportamiento diferente a los de naturaleza fisicoquímica en el laboratorio de ensayo, radica en poder contar con una herramienta gráfica y objetiva que permita registrar, visualizar y analizar los datos generados de los esquemas de control de calidad inherentes a la ejecución de los mismos en forma objetiva y estadísticamente rigurosa. Para el caso de ensayos por técnica de ELISA, recuentos y susceptibilidad antimicrobiana, los resultados de análisis en ocasiones no guardan una distribución normal o no se cuenta con criterios claros para el análisis, lo cual ha restringido su uso en el laboratorio, limitándose en ocasiones a declarar conformidad desde el ámbito cualitativo o el simple cumplimiento de un rango de aceptación establecido, sin poder concretar evidencias objetivas del comportamiento y control estadístico del método.

El presente artículo describe la experiencia del Instituto Nacional de Salud al definir algunas

consideraciones a tener en cuenta a la hora de estructurar una carta de control “a medida” para un ensayo particular, ampliando el concepto de la utilidad de la misma al de un panel de herramientas que en conjunto permiten inferir las características de desempeño del método en términos de precisión y exactitud (cuando aplica), a partir del comportamiento de materiales de referencia y controles internos incluidos en los esquemas de control de calidad aplicables a la ejecución del método de ensayo.

2. METODOLOGÍA

Se establece como punto de referencia para la aplicabilidad y soporte a nuestras actividades de aseguramiento de la calidad, algunos criterios para la construcción de cartas de control que permiten responder a la naturaleza del ensayo; estos criterios se detallan a continuación.

2.1. Distribución de los datos

Para la construcción de las cartas de control se asume la normalidad de los resultados de medida:

cuando se lleva a cabo un método de análisis de forma sistemática, es decir, bajo las mismas fuentes de influencia o variación, el proceso se verá afectado por errores aleatorios que conducirán a una distribución normal de los resultados. Esta afirmación es una consecuencia del teorema del límite central y se dirá que el método analítico está bajo control si los resultados obtenidos con este método siguen las características de una distribución normal. [1]. Para los ensayos por técnicas de ELISA y microbiológicos cuantitativos es necesario en todos los casos evaluar dicha condición previo a la construcción de la carta de control, mediante una herramienta estadística apropiada, a fin de verificar la hipótesis de normalidad (contrastes de normalidad). Cuando se identifique que los datos no guardan la mencionada distribución normal, se debe acudir a alguna función de transformación (típicamente logarítmica) para poderlos normalizar.

2.2. Controles y materiales de referencia

Es claro que las cartas de control se deben construir con datos generados del análisis de materiales caracterizados, presentados en matrices con composición similar a la de las muestras analizadas rutinariamente, relativamente estables en el tiempo y que en lo posible sean externos a los que son suministrados por los estuches o métodos comerciales (controles de tercera opinión); si bien para los ensayos microbiológicos existe buena disponibilidad de material de referencia certificado (cualitativo y cuantificado), para los ensayos por técnicas de ELISA sólo se cuenta con material de referencia caracterizado a nivel cualitativo y con limitantes de comportamiento frente a algunas metodologías.

Ensayos de ELISA: para este tipo de ensayos se cuenta básicamente con tres tipos de materiales para realizar el seguimiento al comportamiento analítico. En primera instancia los estuches comerciales incluyen controles positivos y negativos que se utilizan en el marco de validación de la corrida analítica y que son susceptibles de evaluación mediante la herramienta de carta de control. De otra parte, se dispone de controles multimarcaador (para varias enfermedades infecciosas) y paneles diseñados para validación de los métodos relacionados con patologías particulares. Este material cuenta con gran estabilidad y amplias fechas de vigencia, lo que permite optimizar la inversión realizada, brindando adicionalmente la ventaja de que la matriz es en esencia equivalente a la de las muestras rutinarias objeto de ensayo. Finalmente, de manera alterna se incluyen controles internos correspondientes a

muestras de retención previamente caracterizadas desde el ámbito analítico, criterios clínicos y pruebas complementarias que dan certeza de su condición y les agregan valor como esquemas que aportan al seguimiento al desempeño de los métodos y validación de las corridas analíticas.

Ensayos microbiológicos para identificación y recuento bacteriano: para métodos de ensayo que estiman la densidad poblacional (número más probable) o métodos microbiológicos cuantitativos (filtración por membrana, recuento en placa), se dispone de material de referencia certificado correspondiente a cepas bacterianas plenamente tipificadas (material cualitativo) y adicionalmente se encuentra material cuantificado que cuenta con su respectivo certificado en donde el fabricante declara la incertidumbre asociada al recuento; es ideal que sea fabricado por proveedor acreditado en Guía ISO 34 versión vigente a fin de garantizar la trazabilidad requerida en el marco de los procesos de acreditación. A partir de dicho material es viable preparar en el laboratorio inóculos con rangos de concentración estimados, los cuales permiten evaluar el desempeño del método en el intervalo de trabajo.

Ensayos microbiológicos de susceptibilidad antimicrobiana: para este tipo de ensayo se cuenta con material de referencia certificado, cuya caracterización a efectos de halos de inhibición (susceptibilidad/resistencia) se compara con las especificaciones declaradas en el documento M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing emitido por el Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI.

2.3. Tamaño de muestra

El tamaño ideal de número de datos para la construcción de la carta de control inicial es $n \geq 30$ (teorema del límite central) siendo el mínimo un $n \geq 15$ tomado como el mínimo de réplicas para evaluar repetibilidad [2]. En ambos casos es relevante adicionar un 10% de número de datos al tamaño de muestra ($n \geq 33$ o $n \geq 17$) a fin de tener la oportunidad de eliminar posibles datos atípicos que se identifiquen al momento del análisis.

2.4. Análisis de datos atípicos

Para las cartas de control que registran el control de calidad analítico, los límites deben ser calculados con base en la variación de causa común, lo cual supone que se debe realizar un **análisis de datos atípicos** (outliers) de los datos seleccionados antes de establecer los límites de la carta de control inicial. Para ello se puede utilizar alguna de las herramientas

disponibles para tal fin, siendo la más utilizada el Contraste de Grubb's. En todos los casos se debe tener en cuenta que no es recomendable eliminar más del 10% de los datos bajo análisis; en caso de que se sobrepase dicho límite se obtienen más datos para conformar la base final para la construcción de la carta de control.

2.5 Criterios para definición de límites

Los límites de alerta control se calculan a partir de una serie de datos y permiten definir criterios que deben idealmente ser estables en el tiempo; basados en dichos límites se identifica el grado de variación del proceso analítico, de tal forma que sea posible diferenciar entre variaciones naturales del proceso en cuyo caso no se toman acciones o variaciones especiales ^[3] las cuales deben ser analizadas para establecer si existe una desviación que amerita ser documentada. En este último caso, dicha desviación constituye un *trabajo de ensayo no conforme* que debe registrarse según los lineamientos establecidos en el Sistema de Gestión de calidad.

Adicionalmente es válido complementar los criterios de los límites estadísticos con aquellos establecidos por el método de ensayo y los obtenidos en los ejercicios de validación secundaria (verificación/confirmación) relacionados.

El cálculo de límites estadísticamente válidos se realiza con el fin de que sean mantenidos en el tiempo, sin embargo, existen situaciones en las cuales dichos límites deben recalcularse:

- Cambios en el proceso que no obedezcan a desviaciones del mismo. Un ejemplo típico son los ensayos por técnicas de ELISA cuyo comportamiento de controles es dependiente del lote de reactivo.
- Cambios permanentes en el comportamiento del proceso, justificado técnicamente. Por ejemplo cambio de materiales de referencia.
- Se pueden recalcular límites por criterio técnico; para realizar dicha actualización se debe definir el período de re-cálculo y justificar técnicamente los criterios aplicables.

2.6 Herramientas para la construcción de la carta de control

De acuerdo al parámetro a evaluar es posible utilizar un panel de herramientas, que de manera general se detallan a continuación. En todos los casos para efectos de análisis es opcional incluir el criterio de aceptación determinado en la validación secundaria

(verificación/confirmación) del método y/o el criterio máximo especificado por el mismo.

2.6.1. Control de precisión

Carta de control para Coeficiente de variación (%CV) / Desviación Estándar relativa (%RSD)

La evaluación de precisión se realiza a través del Coeficiente de variación (%) el cual por definición es homólogo a la Desviación Estándar Relativa (%RSD) ^[4]. El término a utilizar dependerá de la forma en que este criterio esté presentado en el Método de ensayo relacionado.

Carta de control para rangos \bar{R}

- Registrar los datos correspondientes a los valores individuales R_i (Máximo valor obtenido–Mínimo valor obtenido) de cada subgrupo de mediciones (se define un máximo de cinco réplicas).
- Calcular el promedio de los rangos obtenidos \bar{R}
- Calcular los límites de control de acuerdo a las siguientes fórmulas utilizando los factores críticos definidos en la Tabla 1 ^[5] así: Límite de control superior: $D_4 \bar{R}$ y Límite de control inferior: $D_3 \bar{R}$.

2.6.2. Control de exactitud

Carta de control de valores individuales X_i

- Esta herramienta permite hacer seguimiento a la tendencia de un proceso analítico con datos variables en donde sólo se realiza una corrida del material de control (único dato X_i), especialmente cuando las mediciones son muy costosas o cuando la característica a medir en cualquier punto en el tiempo es relativamente homogénea, es decir, permite obtener un dato confiable con una sola réplica del material.
- De igual forma permite graficar parámetros puntuales de desempeño de un método tales como porcentaje de recuperación, error relativo, etc.
- La línea central se basa en el promedio \bar{X} , de los datos obtenidos X_i ; los límites de alerta y control se basan en la desviación estándar s ($\pm 2 s$ para Límites de alerta y $\pm 3s$ para Límites de control)

Carta de control de promedio de promedios $\bar{\bar{X}}$

- Esta carta permite hacer seguimiento a la tendencia de un proceso analítico con datos

variables que típicamente son evaluados mediante el promedio de mediciones (se realiza corrida de réplicas del material de control).

- La línea central se basa en el promedio $\bar{\bar{X}}$ de los datos obtenidos al promediar los resultados de cada subgrupo de réplicas (típicamente duplicados); los límites de alerta y control pueden basarse en la desviación estándar s ($\pm 2 s$ para límites de alerta y $\pm 3s$ para límites de control).
- También es válido utilizar constantes estadísticas para su cálculo, en donde al igual que en la anterior herramienta la línea central se basa en el promedio $\bar{\bar{X}}$ de los datos obtenidos al promediar los resultados de cada subgrupo de réplicas

(típicamente duplicados) y se trabajan los límites de control como $A_2\bar{R}$, en donde \bar{R} es el rango promedio de los rangos muestrales, y A_2 es una constante basada en el tamaño de la muestra. Los valores de A_2 se extraen de la tabla de factores críticos de las gráficas o cartas de control [5]. Los límites de control se estiman desde la fórmula $\bar{\bar{X}} \pm A_2 \bar{R}$.

- Si el valor teórico de concentración del material utilizado corresponde a un rango determinado, es útil comparar la media experimental obtenida (mínimo 15 datos válidos) con la media teórica del rango mediante la herramienta t de Student para comparar media experimental con un valor que se asume verdadero.

TABLA					
Factores críticos de las gráficas o cartas de control					
	Gráfica para medias	Gráfica para rangos			
	Factor para el límite de control $A_2 = 3/(d_2\sqrt{n})$	Factor para la recta central d_2	Factores de los límites de control		
n			$D_3 = 1-3(d_3/d_2)$	$D_4 = 1+3(d_3/d_2)$	d_3
2	1,881	1,128	-1,267=0	3,267	0,8525
3	1,023	1,693	-0,574=0	2,574	0,8884
4	0,729	2,059	-0,282=0	2,282	0,8798
5	0,577	2,326	-0,114=0	2,114	0,8641
6	0,483	2,534	-0,004=0	2,004	0,8480
7	0,419	2,704	0,076	1,924	0,8330
8	0,373	2,847	0,136	1,864	0,8200
9	0,337	2,970	0,184	1,816	0,8080
10	0,308	3,078	0,223	1,777	0,7970
11	0,285	3,173	0,256	1,744	0,7870
12	0,266	3,258	0,284	1,716	0,7780
13	0,249	3,336	0,308	1,692	0,7700
14	0,235	3,407	0,329	1,671	0,7620
15	0,223	3,472	0,348	1,652	0,7550
16	0,212	3,532	0,364	1,636	0,7490
17	0,203	3,588	0,379	1,621	0,7430
18	0,194	3,640	0,392	1,608	0,7380
19	0,187	3,689	0,404	1,596	0,7330
20	0,180	3,735	0,414	1,586	0,7290
21	0,173	3,778	0,425	1,575	0,7240
22	0,167	3,819	0,434	1,566	0,7200
23	0,162	3,858	0,443	1,557	0,7160
24	0,157	3,895	0,452	1,548	0,7120
25	0,153	3,931	0,459	1,541	0,7090

Tabla 1: Factores críticos de las gráficas o cartas de control [5]

3. RESULTADOS

En el Instituto Nacional de Salud para los ensayos objeto del presente artículo, se han adoptado una o varias de las metodologías detalladas para estructurar un esquema de control que dé respuesta al método y que adicionalmente presente información para el análisis y aseguramiento de la calidad del resultado. La construcción de las cartas de control debe darse siempre desde el concepto

de aseguramiento aplicable al respectivo método de ensayo, contextualizado según los resultados que genera. Esto implica la revisión bibliográfica, evaluación de los modelos teóricos (que no siempre se aplican de forma directa) y el ejercicio práctico que permite ampliar el contexto de aplicación a todo tipo de ensayos en razón a su naturaleza.

El proceso diseño de “cartas a medida” y su posterior implementación, en general inicia

con la profundización en las características de desempeño del método; posteriormente mediante la articulación de las diferentes herramientas disponibles, se estructura la carta de control específica para el ensayo bajo análisis y se definen los criterios estadísticos o de método aplicables para la interpretación del comportamiento de los diferentes parámetros a evaluar. A continuación, se detallan los criterios adoptados para la construcción:

3.1. Ensayos por técnicas de ELISA

Generalmente los insertos de los fabricantes declaran el comportamiento del método en cuanto a precisión en términos de coeficiente de variación intra e inter ensayo. Por experiencia y frente al escaso soporte documental provisto en los insertos, se debe realizar la búsqueda de los estudios que soportan dicho comportamiento mediante consulta al proveedor/fabricante del reactivo comercial y complementar mediante exploración en la página web del fabricante.

De igual forma reportan la sensibilidad y especificidad asociada al método, información que es muy útil al momento de la estandarización y validación secundaria (verificación/confirmación) del método de

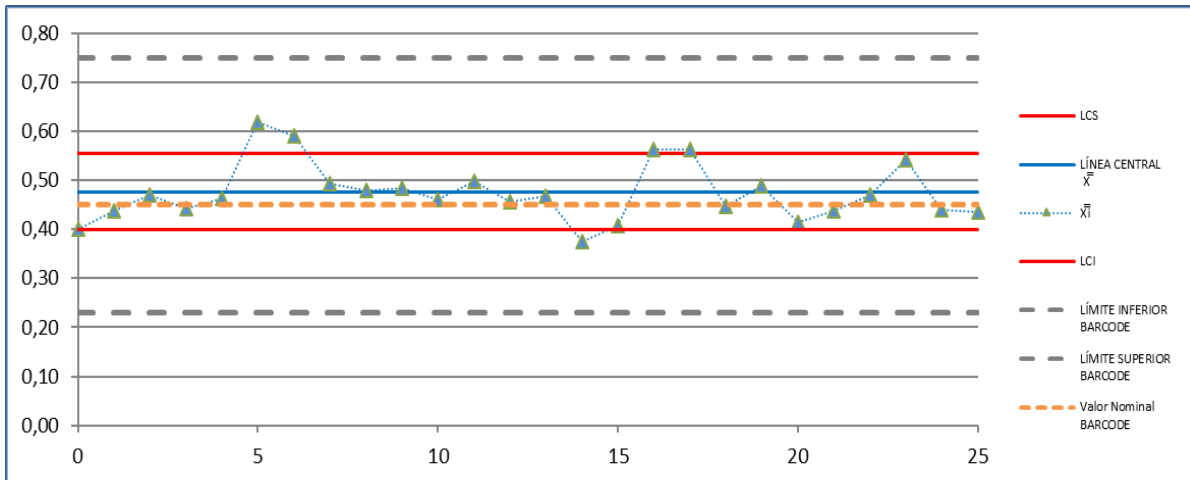
ensayo. En caso de no contar con la información requerida, se define experimentalmente mediante el análisis de la carta de control inicial estructurada con los datos obtenidos del ejercicio de validación secundaria (verificación/confirmación).

Control positivo: para este tipo de material puede realizarse un análisis de precisión en términos de %CV (cuando el fabricante declara el desempeño del método) y de Rangos. De otra parte puede evaluarse la exactitud mediante Carta de control de promedios (generalmente estos controles se procesan mínimo por duplicado) con límites de control establecidos mediante constante estadística (Constante A2). Adicionalmente, si el fabricante declara los límites “teóricos” de absorbancia/fluorescencia para dicho control, estos deben incorporarse a la carta de control ya que definen los límites que se deben guardar en todos los casos, para validar la corrida analítica.

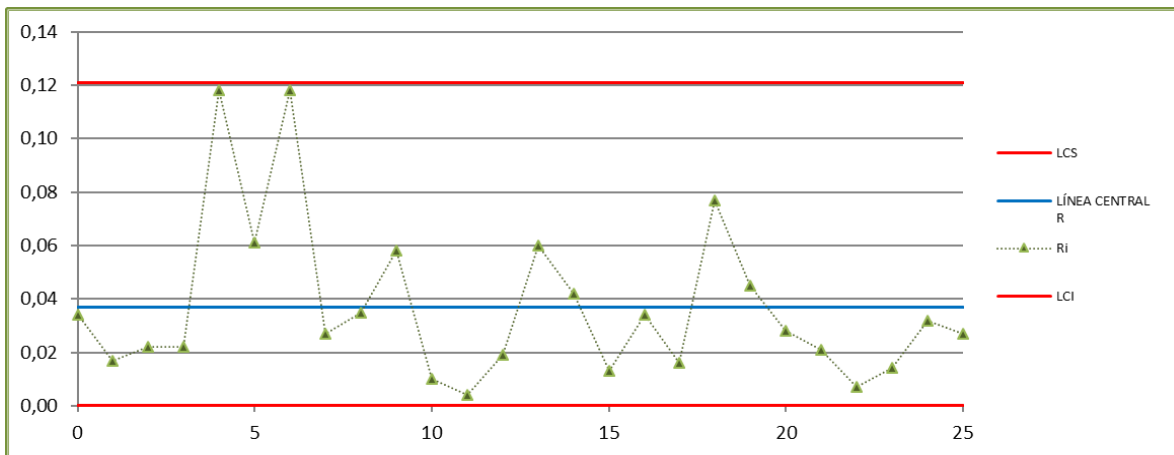
Si el fabricante declara un rango de aceptación del control, es útil aplicar la herramienta t de Student para comparar la media experimental con la media del rango declarado como verdadero.

FECHA (aaaa-mm-dd)	RÉPLICAS Xi		Procesado por	\bar{X}_i	Ri	%CV _(xi)
	1	2				
2015-08-14	0,384	0,418	PAT	0,401	0,034	6,0%
2015-08-18	0,429	0,446	PAT	0,438	0,017	2,7%
2015-08-21	0,458	0,480	PAT	0,469	0,022	3,3%
2015-08-25	0,453	0,431	PAT	0,442	0,022	3,5%
2015-08-28	0,403	0,521	PAT	0,462	0,118	18,1%
2015-09-01	0,648	0,587	PAT	0,618	0,061	7,0%
2015-09-04	0,531	0,649	PAT	0,590	0,118	14,1%
2015-09-08	0,506	0,479	PAT	0,493	0,027	3,9%
2015-09-11	0,462	0,497	PAT	0,480	0,035	5,2%
2015-09-15	0,513	0,455	PAT	0,484	0,058	8,5%
2015-09-18	0,466	0,456	PAT	0,461	0,010	1,5%
2015-09-22	0,499	0,495	PAT	0,497	0,004	0,6%
2015-09-24	0,465	0,446	AMR	0,456	0,019	2,9%
2015-09-28	0,437	0,497	AMR	0,467	0,060	9,1%
2015-10-02	0,397	0,355	AMR	0,376	0,042	7,9%
2015-10-02	0,415	0,402	AMR	0,409	0,013	2,3%
2015-10-06	0,546	0,580	AMR	0,563	0,034	4,3%
2015-10-09	0,571	0,555	AMR	0,563	0,016	2,0%
2015-10-13	0,486	0,409	AMR	0,448	0,077	12,2%
2015-10-16	0,510	0,465	AMR	0,488	0,045	6,5%
2015-10-20	0,428	0,400	PAT	0,414	0,028	4,8%
2015-10-23	0,447	0,426	PAT	0,437	0,021	3,4%
2015-10-26	0,466	0,473	PAT	0,470	0,007	1,1%
2015-10-29	0,548	0,534	AMR	0,541	0,014	1,8%
2015-11-03	0,456	0,424	PAT	0,440	0,032	5,1%
2015-11-06	0,422	0,449	PAT	0,436	0,027	4,4%

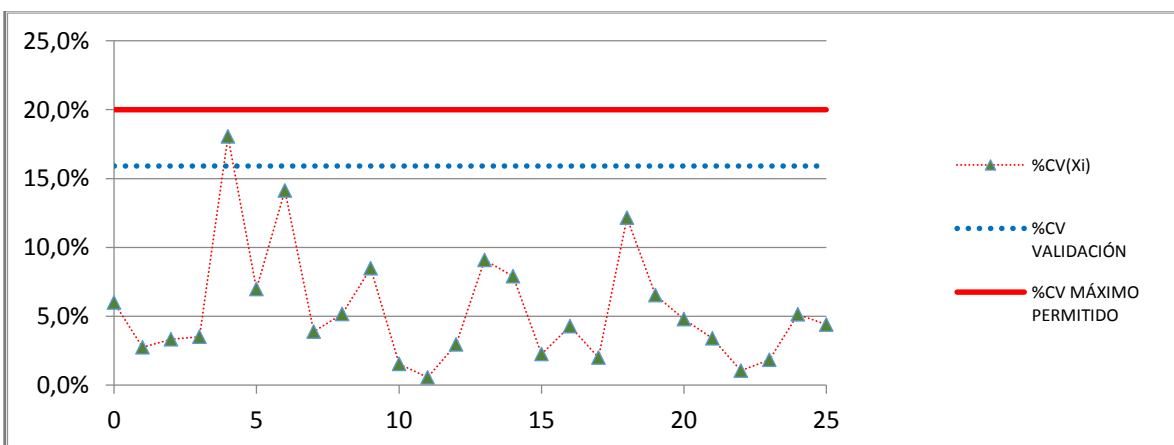
Tabla 2: Ejemplo datos obtenidos de corrida de control positivo para carta de control de exactitud Ensayo por técnica de ELISA INDIRECTA para Determinación de anticuerpos IgM para Rubeola



Gráfica 1. Ejemplo carta de control de exactitud para control positivo.
Ensayo por técnica de ELISA INDIRECTA para Determinación de anticuerpos IgM para Rubeola



Gráfica 2. Ejemplo carta de control positivo, análisis de precisión por rangos.
Ensayo por técnica de ELISA INDIRECTA para Determinación de anticuerpos IgM para Rubeola



Gráfica 3. Ejemplo carta de control positivo, análisis de precisión por coeficiente de variación.
Ensayo por técnica de ELISA INDIRECTA para Determinación de anticuerpos IgM para Rubeola

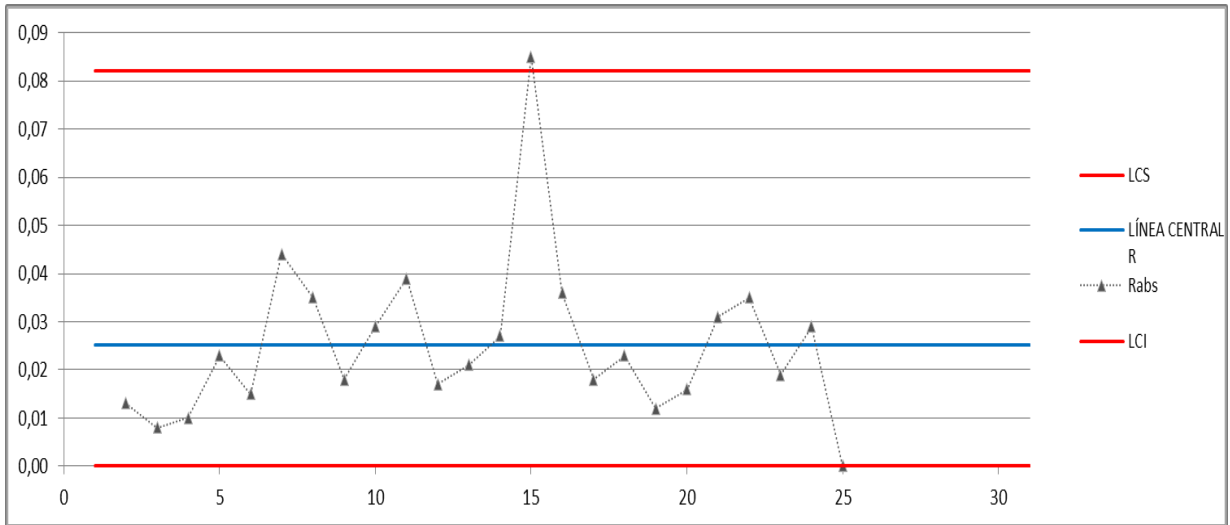
Las gráficas ilustradas corresponden al comportamiento del control positivo para un ensayo de ELISA INDIRECTA para Rubeola IgM en el Grupo Virología – Laboratorio Eruptivas (Tabla 2). En términos de análisis de exactitud (Gráfica 1) se evidencia el comportamiento típico de los controles positivos en donde estadísticamente se observa una variabilidad importante, en ocasiones con algunos puntos fuera del límite de control estadístico, pero siempre dentro de los establecidos por el fabricante para el material objeto de análisis. De igual forma se evidencia que los datos se ubican dentro de los límites para dicho control establecidos por el fabricante (Tabla Barcode). Por otro lado, se evidencia el análisis de precisión en términos de rango (Gráfica 2) y coeficiente de variación (Gráfica 3), que muestran un control del método para dicho parámetro en el marco del desempeño del método según especificación del fabricante y el comportamiento establecido desde la validación secundaria (verificación/confirmación).

Control negativo: en este caso el análisis puede abordarse desde el criterio de precisión en términos de %CV (cuando el fabricante declara el desempeño del método) y Rangos. El análisis de exactitud se realiza mediante carta de control de valores individuales (X_i) o promedios \bar{X} según se procese individualmente o por duplicado. Adicionalmente si el fabricante declara los límites “teóricos” de absorbancia/fluorescencia se deben incorporar a la carta de control, aplicando el mismo criterio detallado anteriormente para el control positivo.

A continuación, se presenta la carta de control de precisión estructurada con base en los datos relacionados en la Tabla 3 – Gráfico 4, donde cabe anotar que dicha precisión se establece como “intermedia” con cambio de día de corrida, teniendo en cuenta que para este método se procesa sólo una réplica del control negativo por corrida analítica de acuerdo a la instrucción del fabricante.

FECHA	ABSORBANCIA	Procesado por	\bar{X}_i	Rabs
	X_i			
2016-01-22	0,045	JCM	0,045	
2016-02-03	0,032	JCM	0,039	0,013
2016-02-26	0,045	JCM	0,041	0,008
2016-03-01	0,037	JCM	0,032	0,010
2016-03-08	0,027	JCM	0,039	0,023
2016-03-31	0,050	JCM	0,043	0,015
2016-04-16	0,035	JCM	0,057	0,044
2016-04-16	0,079	JCM	0,062	0,035
2016-04-16	0,044	JCM	0,035	0,018
2016-04-29	0,026	JCM	0,012	0,029
2016-05-12	-0,003	JCM	0,017	0,039
2016-05-23	0,036	JCM	0,045	0,017
2015-05-24	0,053	JCM	0,043	0,021
2016-05-27	0,032	JCM	0,019	0,027
2016-05-27	0,005	JCM	0,048	0,085
2016-06-07	0,090	JCM	0,072	0,036
2016-06-09	0,054	JCM	0,045	0,018
2016-06-23	0,036	JCM	0,048	0,023
2016-06-27	0,059	JCM	0,053	0,012
2016-07-07	0,047	JCM	0,055	0,016
2016-07-15	0,063	JCM	0,048	0,031
2016-07-18	0,032	JCM	0,050	0,035
2016-07-28	0,067	JCM	0,058	0,019
2016-07-28	0,048	JCM	0,034	0,029
2016-08-02	0,019	LP	0,019	0,000
2016-08-02	0,019	LP		

Tabla 3: Datos obtenidos Ejemplo datos de control negativo para carta de control de precisión
Ensayo por técnica de ELISA TIPO SANDWICH Determinación de anticuerpos IgM para Dengue

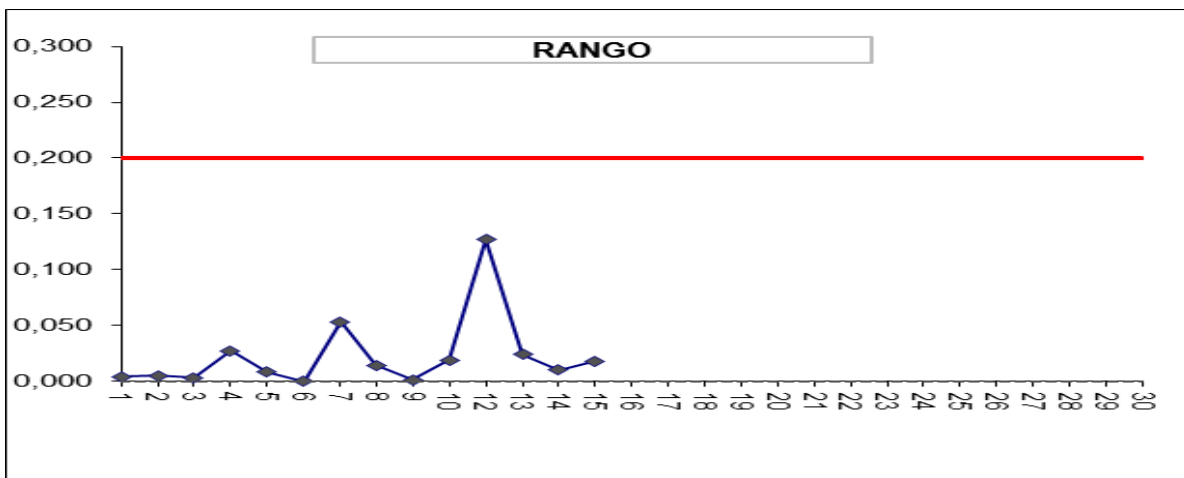


Gráfica 4. Ejemplo carta de control negativo de precisión por rangos. Ensayo por técnica de ELISA TIPO SANDWICH para Determinación de anticuerpos IgM para Dengue

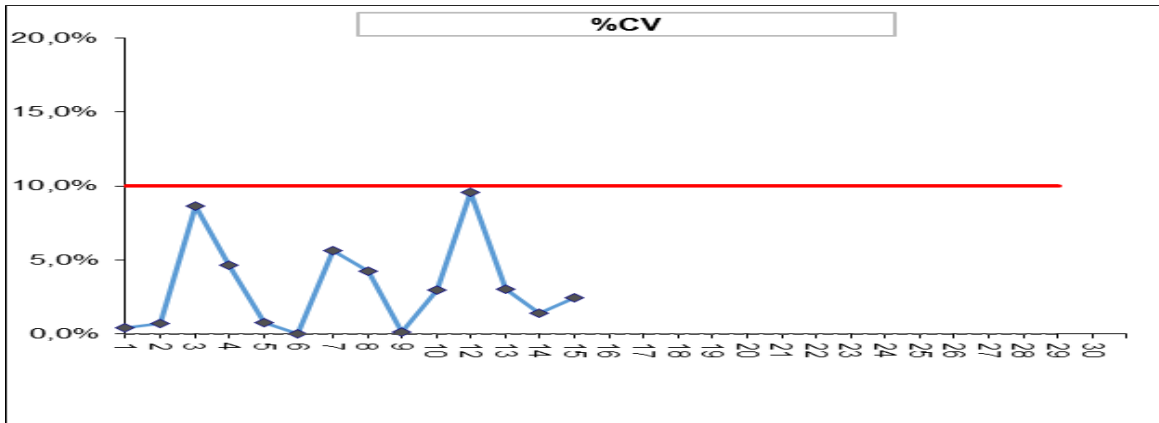
Materiales de referencia comerciales: el análisis de precisión se puede realizar en términos de %CV (cuando el fabricante declara el desempeño del método) y Rangos. El análisis de exactitud para estos casos es limitado, ya que como se comentó anteriormente no vienen caracterizados a nivel cuantitativo; por tal motivo se puede realizar sólo un análisis de comportamiento estadístico mediante Carta de control de promedios (estos controles se procesan mínimo por duplicado) con límites de control establecidos mediante constante estadística (Constante A2).

Las cartas de control para este tipo de material, se estructuran y comportan en forma muy similar a la observada para controles positivos debido a su naturaleza y estabilidad.

Controles internos/Muestras rutinarias: se abordan mediante análisis de precisión en términos de %CV (cuando el fabricante declara el desempeño del método) y Rangos. Este esquema también se aplica a los duplicados que idealmente deben realizarse a un porcentaje de las muestras rutinarias procesadas (típicamente entre el 5% y el 10% del total de muestras trabajadas).



Gráfica 5. Ejemplo carta de control de precisión para duplicados de muestras rutinarias en términos de rango. Ensayo por técnica de ELISA TIPO SANDWICH Determinación de anticuerpos IgM para Dengue



Gráfica 6. Ejemplo carta de control de precisión para duplicados de muestras rutinarias en términos de %CV. Ensayo por técnica de ELISA TIPO SANDWICH Determinación de anticuerpos IgM para Dengue

Las gráficas 5 y 6 ilustran el análisis de precisión en términos de la diferencia entre duplicados al procesar muestras rutinarias en términos de rango con límite de control estadístico y frente al máximo %CV permitido para el método relacionado.

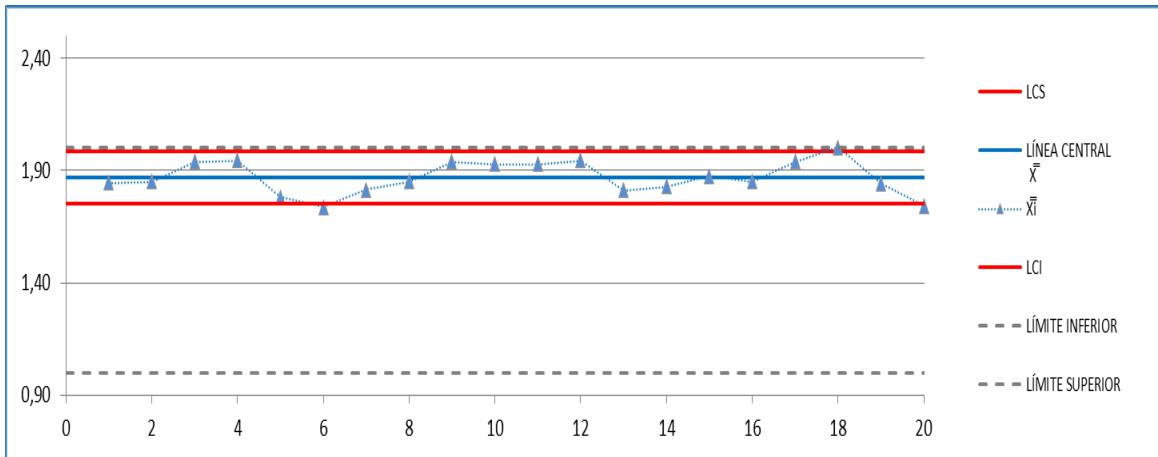
3.2. Ensayos microbiológicos para estimación de densidad poblacional (NMP) y recuentos de colonias

Para ensayos donde se realiza estimación de densidad poblacional o recuentos se realiza transformación logarítmica de los datos antes de proceder a la construcción de la carta de control.

Material de referencia certificado: los datos generados del procesamiento se analizan para evaluar la precisión (desde la concentración en rango del inóculo preparado) en términos de %CV (cuando se cuenta con esta información para el desempeño del método) y rangos. Dado que estos materiales típicamente no se procesan por duplicado en una corrida analítica, el análisis de precisión se realiza entre corridas (precisión intermedia). De igual forma se realiza análisis de exactitud con carta control de valores individuales X_i con límites de control calculados mediante constante estadística (A_2), incorporando los límites teóricos del rango de concentración del inóculo objeto del control de calidad analítico.

FECHA	RECuento OBTENIDO	TRANSFORMACIÓN A LOG10 (Si el recuento es <1 registrar 1)	Procesado por	\bar{X}_i
2016-01-15	70	1,85	MYD	1,85
2016-01-15	72	1,86	MYD	1,85
2016-01-15	105	2,02	MYD	1,94
2016-01-15	74	1,87	MYD	1,95
2016-01-15	49	1,69	MYD	1,78
2016-01-15	61	1,79	MYD	1,74
2016-01-15	70	1,85	MYD	1,82
2016-01-15	72	1,86	MYD	1,85
2016-01-15	105	2,02	MYD	1,94
2016-01-15	68	1,83	MYD	1,93
2016-01-15	105	2,02	MYD	1,93
2016-01-15	74	1,87	CP	1,95
2016-01-15	57	1,76	CP	1,81
2016-01-15	80	1,90	CP	1,83
2016-01-15	70	1,85	CP	1,87
2016-01-15	72	1,86	CP	1,85
2016-01-15	105	2,02	CP	1,94
2016-01-15	96	1,98	CP	2,00
2016-01-15	50	1,70	CP	1,84
2016-01-15	61	1,79	CP	1,74

Tabla 4: Datos obtenidos al procesar inóculo 10 ufc/ml a 100 ufc/ml para método NMP Coliformes totales (datos transformados logarítmicamente). Método Sustrato definido Colillert



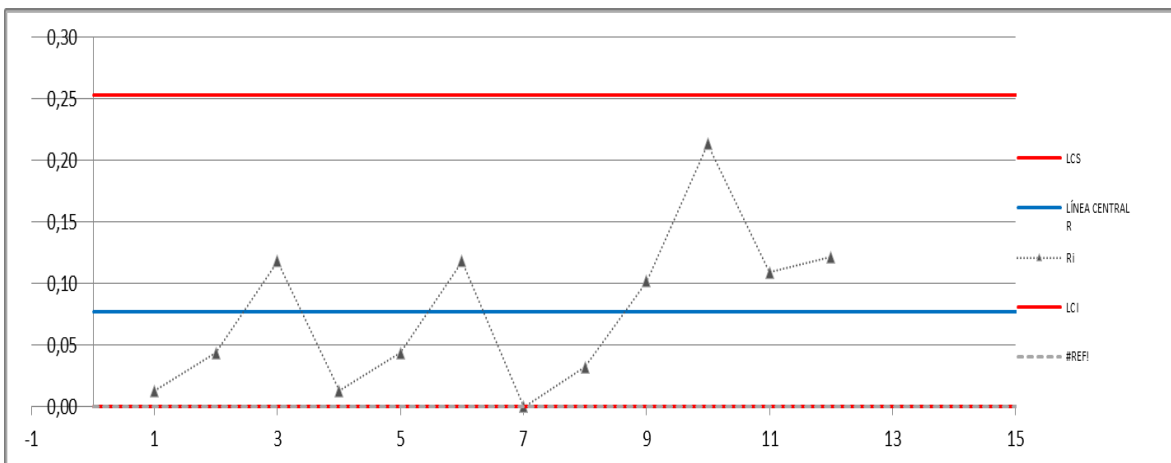
Gráfica 7. Ejemplo carta de control de exactitud para ensayo NMP Coliformes totales (datos transformados logarítmicamente). Método Sustrato definido Colillert

Para este tipo de material de los datos presentados en la Tabla 4 – Gráfico 7 se evidencia un comportamiento estadístico razonable dentro de los límites teóricos de la concentración del inóculo, aunque la dificultad de estandarizarlo muestra que para el caso, dicha densidad se sesgó hacia el límite superior del rango. Los datos de este ejemplo se generaron de un ejercicio de estandarización, en donde los promedios de concentración se obtuvieron entre datos

sucesivos correspondientes a preparaciones independientes de inóculo.

Muestras rutinarias: típicamente se debe procesar por duplicado al menos una de las muestras procesadas (idealmente del 5% al 10% del total de muestras).

Para estos casos se debe realizar un análisis de precisión en forma análoga a la establecida para los materiales de referencia.



Gráfica 8. Ejemplo carta de control de precisión para ensayo NMP Coliformes totales (datos transformados logarítmicamente). Método Sustrato definido Colillert

3.3 Ensayos microbiológicos de susceptibilidad antimicrobiana

Para este tipo de ensayos se trabaja con material de referencia certificado cuyo criterio de verdad para susceptibilidad se establece desde la trazabilidad metrológica del material

(tipificado y fabricado por proveedor acreditado en Guía ISO 34 versión vigente) y los halos de inhibición declarados en el M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing emitido por el Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI.

Típicamente estos datos guardan una distribución normal y el análisis y construcción de cartas de control puede ser realizada directamente con los datos obtenidos, trabajando individualmente cada antibiótico incorporado al panel de susceptibilidad.

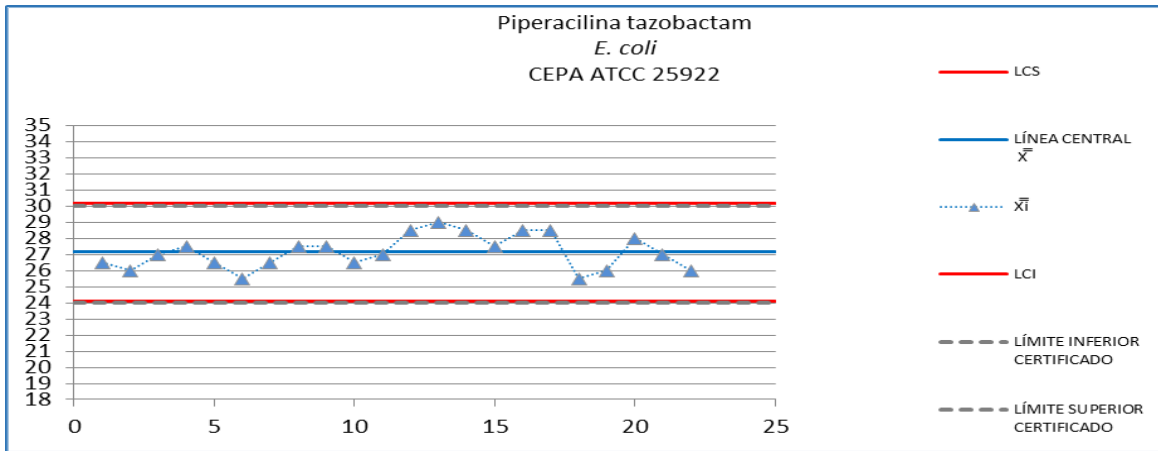
Se realiza un análisis de precisión en términos de %CV y rangos. Dado que estos materiales típicamente no se procesan por duplicado en una corrida analítica, el análisis de precisión se realiza entre corridas (precisión intermedia) y los criterios de aceptación/rechazo se establecen experimentalmente. De igual forma se realiza análisis de exactitud con carta de control de valores individuales X_i con límites de control calculados mediante constante

estadística (A_2), incorporando los límites teóricos del rango de halo de inhibición declarado en el M100 CLSI.

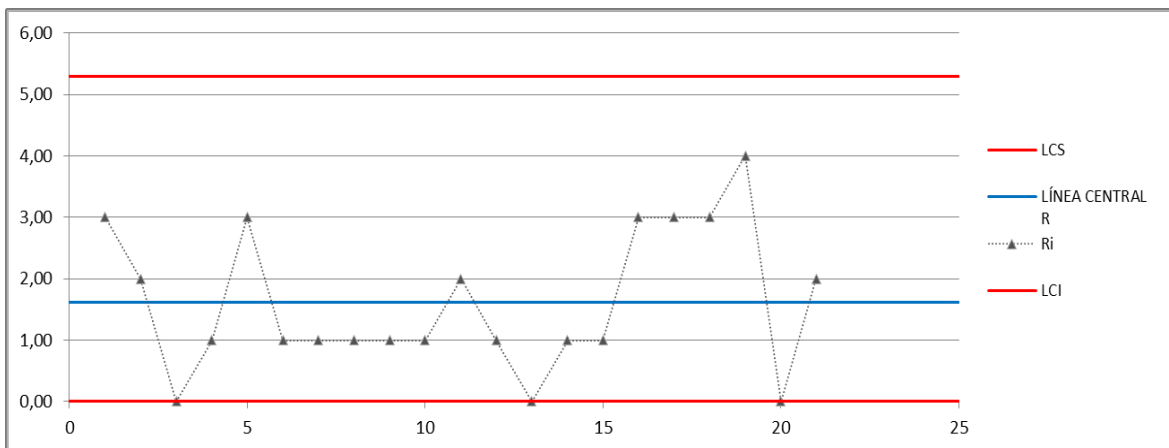
El ejemplo que se ilustra a continuación (Tabla 5 – Gráficas 9, 10 y 11) muestra el comportamiento típico a efectos de análisis de exactitud y precisión de una Cepa ATCC frente a un antibiótico determinado. Se evidencia cumplimiento frente a los criterios establecidos estadísticamente y M100 CLSI en cuanto a exactitud en coherencia con la cepa ATCC trabajada y comportamiento dentro de límites estadísticos para el caso de precisión (rango y %CV).

FECHA	TAXO ANTIBIÓTICO		X_i	Procesado por	\bar{X}_i	R_i	%CV _(X_i)
	LOTE	FECHA DE VENCIMIENTO					
2015-01-14	3024354	2015-06-30	28	AMH	27	3	8,0%
2015-01-21	3024354	2015-06-30	25	AMH	26	2	5,4%
2015-01-30	3024354	2015-06-30	27	AMH	27	0	0,0%
2015-02-03	3024354	2015-06-30	27	AMH	28	1	2,6%
2015-02-11	3024354	2015-06-30	28	AMH	27	3	8,0%
2015-02-18	3024354	2015-06-30	25	AMH	26	1	2,8%
2015-02-25	3024354	2015-06-30	26	AMH	27	1	2,7%
2015-03-04	3024354	2015-06-30	27	AMH	28	1	2,6%
2015-03-11	3024354	2015-06-30	28	AMH	28	1	2,6%
2015-04-01	3024354	2015-06-30	27	MVO	27	1	2,7%
2015-04-08	3024354	2015-06-30	26	MVO	27	2	5,2%
2015-04-17	3024354	2015-06-30	28	MVO	29	1	2,5%
2015-04-23	3024354	2015-06-30	29	MVO	29	0	0,0%
2015-04-30	3024354	2015-06-30	29	MVO	29	1	2,5%
2015-05-06	231691	2016-05-31	28	MVO	28	1	2,6%
2015-05-13	231691	2016-05-31	27	MVO	29	3	7,4%
2015-05-22	231691	2016-05-31	30	MVO	29	3	7,4%
2015-06-03	231691	2016-05-31	27	AMH	26	3	8,3%
2015-06-18	231691	2016-05-31	24	AMH	26	4	10,9%
2015-07-07	231691	2016-05-31	28	AMH	28	0	0,0%
2015-07-15	231691	2016-05-31	28	AMH	27	2	5,2%
2015-07-29	231691	2016-05-31	26	AMH	26		

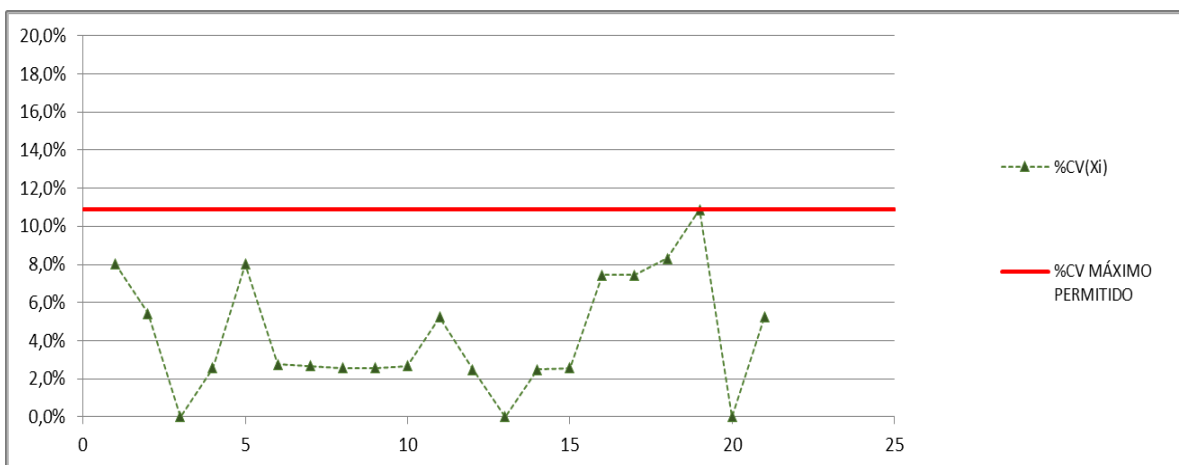
Tabla 5: Datos obtenidos de procesamiento de cepa ATCC 25922 *Escherichia coli* por método Susceptibilidad antimicrobiana - Método difusión en disco Kirby Bauer



Gráfica 9. Ejemplo carta de control de exactitud para ensayo de susceptibilidad antimicrobiana Método Kirby Bauer Cepa ATCC 25922 *Escherichia coli*



Gráfica 10. Ejemplo carta de control de precisión por rangos para ensayo de susceptibilidad antimicrobiana Método Kirby Bauer Cepa ATCC 25922 *Escherichia coli*



Gráfica 11. Ejemplo carta de control de precisión por coeficiente de variación para ensayo de susceptibilidad antimicrobiana. Método Kirby Bauer Cepa ATCC 25922 *Escherichia coli*

4. DISCUSIÓN

Una de las mayores ventajas de implementar el modelo de cartas de control mediante el enfoque de “carta a la medida” según las características del ensayo, es que permite profundizar en la apropiación y evaluación objetiva del comportamiento del mismo, brindando elementos objetivos, concretos y suficientes para la toma de decisiones durante los procesos analíticos, con el fin de asegurar la calidad del resultado, que en esencia es el objetivo fundamental de cualquier laboratorio de ensayo independientemente del portafolio de servicios ofertado.

Para su desarrollo, el modelo requiere de interacción multidisciplinaria entendida como la participación de analistas que tengan un conocimiento profundo del método, su comportamiento, el uso previsto de los resultados y profesionales con formación afín a los ensayos relacionados, con bases estadísticas importantes. Esto puede representar un grado significativo de dificultad en el diseño de las cartas de control, por lo cual, justamente este tipo de publicaciones pretende brindar criterios prácticos y aplicables al tema.

5. CONCLUSIONES

El trabajo realizado responde a las necesidades identificadas en los diferentes laboratorios de la Subred Salud, relacionadas con la orientación de criterios y esquemas de control de calidad analítico para aplicación en ensayos de naturaleza diferente a la fisicoquímica, como son los ensayos por técnicas de ELISA y microbiológicos, basados en la revisión de literatura y el desafío real.

La implementación de los modelos propuestos en los Grupos de la Dirección de Redes en Salud Pública del Instituto Nacional de Salud, el ejercicio de aplicación y diseño de “cartas a medida” en los laboratorios basados en los principios y complejidades de los métodos de ensayo, ha permitido el fortalecimiento técnico a través del montaje de esquemas de control y aseguramiento de la calidad del resultado prácticos y de gran utilidad en la rutina analítica de los laboratorios.

De igual forma, la aplicación de los aspectos abordados en el presente artículo hace posible estructurar lineamientos documentados en el marco del Sistema de Gestión de Calidad del Laboratorio, los cuales permiten definir criterios de construcción e interpretación de cartas de control, las cuales brindan evidencias objetivas del control estadístico de los métodos de ensayo a través de los esquemas de control de calidad asociados, todo ello enmarcado en criterios de aceptación/rechazo definidos por quien desarrolló el método o determinados experimentalmente. En resumen, permiten asegurar la calidad del resultado mediante el seguimiento a comportamiento y tendencias, implementación de acciones correctivas cuando se presentan desviaciones o medidas preventivas cuando se evidencian tendencias.

Como contribución adicional, la experiencia y revisión del tema será insumo de lineamientos técnicos y socializaciones a los diferentes laboratorios a nivel nacional, en el marco del fortalecimiento técnico requerido.

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección de Redes en Salud Pública por permitir la exploración, experimentación e implementación de criterios innovadores para el fortalecimiento de los esquemas de aseguramiento de la calidad del resultado. A los Grupos Virología, Salud Ambiental y Microbiología de la DRSP por su aporte técnico en la construcción y desafío de los modelos estructurados.

REFERENCIAS

- [1] UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI Jordi Riu. Gráficos de control de Shewhart (en línea) http://www.quimica.urv.cat/quimio/general/grafics_de_control.pdf (consultado en 2016-06).
- [2] EURACHEM. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Second edition. 2014. pp 35-37
- [3] IQI MARÍA GUADALUPE CADENAS TREJO. Herramientas para CEC Unidad 3 – Cartas de control < <https://ingenieriaindustrialupvmtareasytrabajo>

s.files.wordpress.com/2012/08/cartas-de-control-por-variables.pdf> 2016-08.

[4] MILLER N.J., MILLER J.C. Estadística y quimiometría para química analítica. 2002.

[5] SUAREZ M. Interaprendizaje de Probabilidades y Estadística Inferencial con

Excel, Winstats y Graph. 2012.
<http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/940/1/Interaprendizaje%20de%20Probabilidades%20y%20Estad%C3%ADstica%20Inferencial%20con%20Excel,%20Winstats%20y%20Graph.pdf> (consultado en 2016-09).