



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

“Verificación del equipo ADVIA Centaur para la determinación cuantitativa de la proteína HER-2/*neu* en el Instituto Nacional de Cancerología”

TESINA PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALISTA EN
BIOQUÍMICA CLÍNICA

PRESENTA:

Q.F.B.: Irazú Gordillo López

Tutor: Biol. Blanca Estela Santinelli Núñez



CIUDAD DE MÉXICO

NOVIEMBRE 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por permitirme vivir y culminar esta etapa de mi vida.

Papito, Mamita y Ale porque sin ustedes, sin su apoyo y su aliento simplemente no estaría aquí, este logro es por y para ustedes.

Tía Anita, Estelita, Carlitos, gracias por abrirme las puertas de su casa y corazón gracias por apoyarme todos los días.

Bióloga Blanca, Lizbeth, Rubén, Tere, Escandi, Q. Ricardo, Saúl, Maru. Gracias por cada consejo, regaño, apoyo que hizo de mí una profesionista competente.

Amigos: Álvaro, Lorena, Rita, Erendira, Josué, Hugo, Liliana, Alexia, Karlita, Cristina, Zhere, gracias por apoyarme, aconsejarme, jalarme las orejas, pero sobre todo por creer en mí.

Dr. José, Dr. Rodolfo, MASS Eva, M.C. Guadalupe y M.C. Julio. Gracias por su apoyo, tiempo y consejos, porque sin ustedes este trabajo no habría culminado con éxito.

¡MUCHAS GRACIAS!

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: En el laboratorio clínico, es necesario que todo equipo analítico antes de utilizarse en la práctica diaria sea sometido a una evaluación, la cual recibe el nombre de verificación; ésta consiste en analizar los parámetros de linealidad, precisión, veracidad e incertidumbre bajo las condiciones propias del laboratorio y garantizar así resultados confiables. **OBJETIVO:** Verificar, mediante la “Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico” propuesta por la ema, el desempeño analítico del equipo ADVIA Centaur para la determinación cuantitativa de HER-2/neu. **MATERIAL Y MÉTODOS:** Se verifico el Equipo ADVIA Centaur (Siemens, USA), el parámetro de linealidad mediante el uso de sueros control bajo y alto, calibradores H2n bajo y alto para calibrar el ensayo, evaluar precisión, exactitud e incertidumbre, controles H2n Nivel 1 (Bajo) y Nivel 2 (Alto) para evaluar el control de calidad interno y la “Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico” propuesta por la ema. **RESULTADOS:** En linealidad se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.992 muy cercano a 1 por lo que se acepta el parámetro, la precisión del método después de analizarlo con test de significancia estadística F se demostró que no existe una diferencia estadística significativa entre las varianzas por lo que se acepta el parámetro, con respecto a la veracidad del método el porcentaje de recuperación obtenido en la verificación fue de 99.35%, según la guía de la ema el valor debe ser igual o lo más cercano a 100%, por lo tanto se acepta el parámetro. Se obtuvo ± 11.5 ng/ml de incertidumbre lo que indica que en un resultado reportado existe un 95% de probabilidad de que el valor verdadero se encuentre entre ese intervalo de valores. La población presentó valores menores a 15 ng/ml de HER-2/neu tal y como lo indica la literatura y el inserto; por lo que se acepta el traslado de límites de referencia. **CONCLUSIÓN:** Los resultados obtenidos indican que la determinación cuantitativa de HER-2/neu en el equipo ADVIA Centaur es adecuado para su uso en el laboratorio y satisface los requerimientos de calidad establecidos.

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 CÁNCER DE MAMA	6
1.2 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA	6
1.3 DIAGNÓSTICO	7
1.4 HER-2/neu	8
1.5 QUIMIOLUMINISCENCIA DIRECTA	9
1.5.1. SISTEMA ADVIA CENTAUR	10
1.5.2 FORMATO SANDWICH	11
1.6 CONTROL DE CALIDAD EN EL LABORATORIO CLÍNICO	13
1.7 VALIDACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS DE EXAMEN	17
1.7.1 VERIFICACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE DESEMPEÑO DE LOS PROCEDIMIENTOS DE EXAMEN	19
1.7.2 PARÁMETROS DE DESEMPEÑO DE LOS PROCEDIMIENTOS DE EXAMEN	20
A) LINEALIDAD	20
B) EXACTITUD	21
B.1) PRECISIÓN	22
B.2) VERACIDAD	23
C) INCERTIDUMBRE	24
1.8 TRASLADO DE LÍMITES DE REFERENCIA	26
2. ANTECEDENTES	28
3. JUSTIFICACIÓN	29
4. HIPÓTESIS	29
5. OBJETIVOS GENERALES	30
5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
6. MATERIAL Y MÉTODOS	30
7. RESULTADOS	35
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	42

9. CONCLUSIONES	44
10. BIBLIOGRAFÍA	45
11. ANEXOS	50
11.1 ANEXO A (DEFINICIONES Y TÉRMINOS)	50
11.2 ANEXO B (DOCUMENTOS Y PROTOCOLOS INTERNACIONALES ESCRITOS POR LA CLSI)	56
11.3 ANEXO C (ENCUESTA PARA PARTICIPAR EN EL TRASLADO DE LÍMITES DE REFERENCIA)	58

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CÁNCER DE MAMA

El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de células que puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo. En algunas ocasiones el tumor puede invadir tejidos circundantes o puede propagarse a áreas distantes del cuerpo, proceso que se conoce como metástasis. El cáncer de mama es un proceso oncológico en el que células sanas de la glándula mamaria degeneran y se transforman en tumorales, estas proliferan y se multiplican hasta posteriormente constituir el tumor. El interior de la mama se compone de una serie de glándulas mamarias de mayor y menor tamaño, conectadas entre sí por unos conductos finos llamados galactóforos que presentan la apariencia de ramilletes. La mayoría de los cánceres de seno comienza en las células que recubren los conductos y se conocen como cánceres ductales, algunos otros cánceres de seno se originan en las células que recubren los lobulillos causando cánceres lobulillares, mientras que un pequeño número se origina en otros tejidos. (American Cancer Society, 2014; ROCHE, 2011). Alrededor del 5 al 6% de las pacientes con cáncer de mama presentan cáncer de mama metastásico (CMM) al diagnóstico y el 30% de las mujeres diagnosticadas en un estadio precoz de la enfermedad experimentan una recurrencia del cáncer con metástasis a distancia. (Altekruse, et al., 2010; Global Cancer Facts & Figures, 2015; EBCTCG, 2005).

1.2 EPIDEMIOLOGIA DEL CÁNCER DE MAMA

Según datos de la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) de la Organización Mundial de la Salud en 2012 fueron diagnosticadas 1.7 millones de mujeres con cáncer de mama. Desde las estimaciones de 2008 hasta el 2012, la incidencia de cáncer de mama ha aumentado en más del 20%, mientras que la mortalidad ha aumentado en un 14%. Y este cáncer es también la causa más común de muerte por cáncer entre las mujeres (522,000 muertes en 2012) y el cáncer

con mayor frecuencia en 140 de 184 países estudiados. (Ferlay et al., 2013). En cuanto a la magnitud del cáncer de mama en México, a partir de 2006 éste ocupa el primer lugar de mortalidad por tumor maligno en mujeres mayores de 20 años, desplazando de esa posición al cáncer cervicouterino. En el año 2013, el cáncer de mama fue la principal causa de morbilidad hospitalaria (18.7%); 3 de cada 10 mujeres fueron hospitalizadas a causa de esta enfermedad. En el año 2014 se presentó la incidencia más alta con 28.75 casos nuevos por cada 100 mil mujeres. (INEGI, 2015)

1.3 DIAGNÓSTICO

Cuando se tiene la sospecha clínica ésta debe ser confirmada por imágenes es decir mastografía y ultrasonido (US) mamario, además de incluir un historial clínico completo y examen físico, pruebas de hematología y bioquímica, imágenes de tórax, abdomen y hueso. En determinadas situaciones, la información puede ser proporcionada por imágenes funcionales como Tomografía Computarizada Por Emisión de Positrones (PET-CT), Resonancia Magnética de Contraste Dinámico (DCE-MRI) o Resonancia Magnética Ponderada por Difusión (MR-DWI). (Cardoso et al., 2012)

Se debe realizar la confirmación histopatológica mediante técnicas inmunohistoquímicas (IHC) y/o de Hibridación Fluorescente *In Situ* (FISH) siempre que sea técnicamente factible, particularmente en la situación de una lesión metastásica aislada. Los marcadores biológicos importantes para las decisiones de tratamiento son los receptores de hormonas de estrógeno (RE), de progesterona (RP) así como el estado HER-2. Si las células tienen receptores de estrógeno el tumor se denominará RE-Positivo, y si tienen receptores de progesterona el tumor se denominará RP-Positivo, si las células no tienen ninguno de estos dos receptores, el tumor es RE/RP-Negativo. La determinación de la expresión RE/RP es un proceso habitual durante el diagnóstico del cáncer de mama ya que la sobreexpresión es un factor pronóstico y predictivo de respuesta a terapia endócrina. Cuando el resultado es RE/RP-Negativo, es necesario analizar la sobreexpresión del gen *Her-2/neu*. (Hammond et al., 2010; Cardoso et al., 2012).

1.4 HER-2/*neu*

En los últimos años, el estudio de los oncogenes celulares ha sido uno de los campos de mayor investigación dentro de la Biología Molecular y la Medicina. Se conoce que la activación y la sobre-expresión de estos oncogenes cumplen un importante papel en el desarrollo del cáncer, lo que permite obtener información adecuada para la evaluación de las decisiones terapéuticas a aplicar en cada caso. Dentro de esta familia de oncogenes se encuentra el HER-2/*neu*, sus siglas provenientes de Human Epidermal Growth Factor Receptor-2. El gen HER-2/*neu* codifica un receptor para factores de crecimiento que se expresa en células epiteliales normales. Es una proteína, denominada p185, de 185 kDa de peso molecular, presente en la superficie celular con funciones en el crecimiento y proliferación celular.

La oncoproteína HER-2/*neu* está compuesta por tres dominios:

- a) Dominio citoplasmático, con actividad tirosina de cinasa.
- b) Dominio transmembrana.
- c) Dominio extracelular (DEC), que es la porción que interactúa con los factores de crecimiento y con los dominios extracelulares de otros miembros de la familia HER-2/*neu*; como HER-1, HER-3 y HER-4 que también son receptores de la superficie celular para factores de crecimiento. (Mamani et al., 2014)

La sobreexpresión o amplificación de HER-2/*neu* se encuentra presente entre el 10-30% de los carcinomas infiltrantes de mama, y se asocia a una mayor agresividad biológica del tumor y modifica la respuesta a distintas modalidades de tratamiento. La proteína constituye, además, la diana terapéutica del Trastuzumab (Herceptin®, Genentech), utilizando anticuerpos anti-HER-2 que se emplea en estadios avanzados de la enfermedad con respuestas clínicas significativas. (González et al, 2007)

Existen dos pruebas de oro para el diagnóstico de la sobreexpresión o amplificación de HER-2/*neu*. La primera es una prueba inmunohistoquímica en la que se cuantifica la proteína producto de la expresión del oncogén en la superficie de la célula, y la segunda es la técnica de FISH; en la que se determina el número de copias del gen p185 que poseen las células del tumor. Teniendo en cuenta el carácter predictivo de

la caracterización de los receptores hormonales y de HER-2, estos datos se usan conjuntamente con otros aspectos, como las características histopatológicas del tumor primario, en la decisión de seleccionar la mejor estrategia terapéutica. Sin embargo, además de los métodos de inmunohistoquímica y de FISH, se han desarrollado inmunoensayos como ELISA y Quimioluminiscencia Directa, para medir el Dominio Extracelular (DEC). Ambas técnicas han sido aprobadas por la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) de Estados Unidos para el tratamiento y seguimiento de pacientes con cáncer de mama metastásico que tienen un valor inicial de HER-2/*neu* por encima del corte normal, es decir por arriba de 15 ng/ml. Diversos estudios demostraron que el monitoreo de los niveles séricos de HER-2/*neu* en pacientes con cáncer de mama metastásico puede brindar información en tiempo real del estado de la patología y determinar si existe respuesta al tratamiento, además de que los valores obtenidos de HER-2/*neu* pueden utilizarse en el seguimiento y el control de pacientes con cáncer de mama metastásico cuyo nivel inicial de HER-2/*neu* en suero sea superior a 15 ng/mL. Niveles en disminución indicarían respuesta al tratamiento, mientras que niveles en aumento sugerirían que la enfermedad está progresando. (Verdú et.al., 2005; Estava et al, 2005; Carney, 2007; Ludovini, et al., 2008).

1.5 QUIMIOLUMINISCENCIA DIRECTA

Al igual que la fluorescencia, la luminiscencia es una variación del método estándar de ELISA, en la que una enzima transforma un substrato en un producto que emite fotones en lugar de dar color visible. La luminiscencia se describe como la emisión de luz por parte de una sustancia que regresa a su estado original desde un estado electrónicamente excitado. Las diferentes formas de luminiscencia difieren, precisamente, en la forma en que se alcanza dicho estado excitado:

- a) **Fotoluminiscencia:** la excitación se alcanza mediante luz de una determinada longitud de onda, es decir, igual que en la fluorescencia.
- b) **Bioluminiscencia:** la excitación se alcanza mediante la utilización de un compuesto que emite luz al ser degradado, por ejemplo, luciferina o luciferasa.

c) **Quimioluminiscencia:** la excitación se alcanza mediante una reacción química.

Actualmente este es el método disponible más sensible debido a la posibilidad de multiplicación y amplificación de la señal. Las reacciones de luminiscencia se miden en Unidades Relativas de Luz (RLU), que son típicamente proporcionales a la cantidad de muestra presente (Cultek, 2006).

Weeks y colaboradores en 1984 desarrollaron una nueva técnica basada en la quimioluminiscencia, la cual emplea como fase sólida micropartículas paramagnéticas (PPM) recubiertas de anticuerpos específicos contra la sustancia a analizar y como marca el éster de acridina (EA). Las partículas paramagnéticas empleadas en estos ensayos ofrecen una máxima superficie de contacto (100 veces más que los métodos convencionales) y una rápida separación magnética con una mínima unión inespecífica (García y Martínez, 2007).

1.5.1 SISTEMA ADVIA CENTAUR

El sistema de inmunoensayo ADVIA Centaur es una marca comercial registrada de Siemens Healthcare Diagnostics, USA. Se introdujo a finales de los años noventa, es un instrumento completamente automatizado de inmunoensayo para laboratorios de volumen medio, es fácil de manejar, aumenta la eficiencia y flujo de trabajo, ofrece la excelente sensibilidad y especificidad esperada de la tecnología de quimioluminiscencia directa. El equipo ADVIA Centaur permite que su laboratorio proporcione un excelente cuidado al paciente al traer una amplia gama de inmunoensayos a un solo puesto de trabajo, incluyendo enfermedades infecciosas y HER-2/*neu* sérico (**Imagen 1**). (Rosso et al., 2016). Mide directamente la cantidad de luz que emite la reacción de quimioluminiscencia utilizando EA como marcador en el reactivo lumínico y PPM como fase sólida. El sistema usa varios formatos para detectar antígenos y anticuerpos, aplicando los principios de unión del inmunoensayo de los anticuerpos, tales como:

- Formato sandwich.

- Formato competitivo.
- Formato de captura de anticuerpos.

El diagnóstico *in vitro* de la determinación cuantitativa sérica de la proteína HER-2/*neu* en el equipo ADVIA Centaur se realiza bajo el formato sandwich (ADVIA Centaur, 2008).



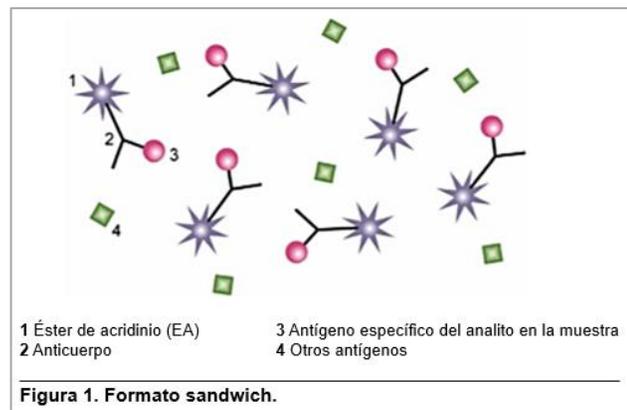
Imagen 1. Equipo ADVIA Centaur

1.5.2. FORMATO SANDWICH

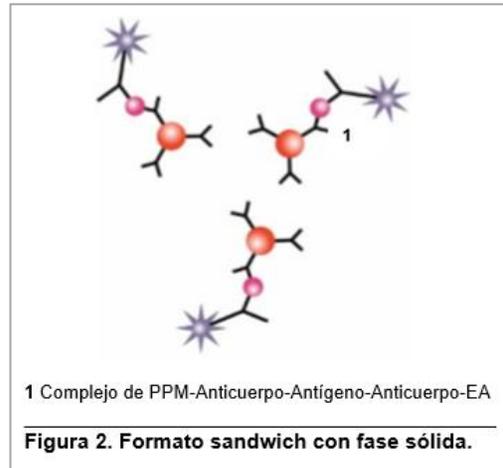
Los formatos de ensayo no competitivos generalmente proporcionan el nivel más alto de sensibilidad y especificidad, a este formato se le conoce como ensayo “sandwich” ya que el analito está unido (como un sandwich) entre dos reactivos de anticuerpo muy específicos. (Manual del usuario, ADVIA Centaur, 2008).

A continuación, se describen paso a paso las etapas de la reacción:

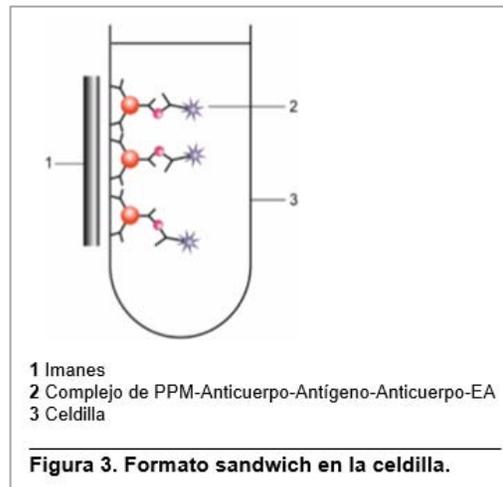
1. El sistema añade reactivo lumínico, que contiene el anticuerpo marcado con EA a la muestra, el anticuerpo marcado con EA se une al antígeno específico del analito de la muestra (**Figura 1**).



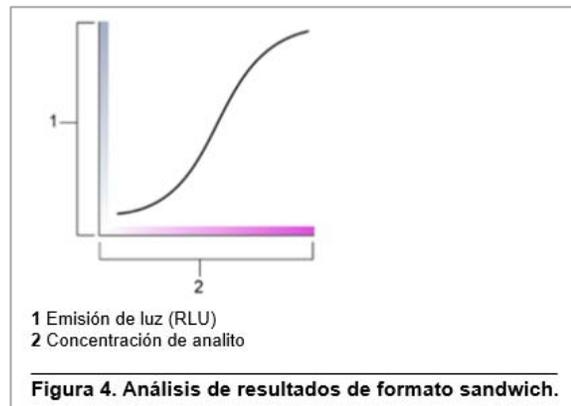
2. El sistema añade fase sólida que contiene PPM recubiertas con anticuerpo específico del antígeno de la muestra. El sistema incuba la cubeta a 37 °C (98.6 °F). Las PPM se unen a los antígenos que están unidos al anticuerpo marcado con EA, formando el inmunocomplejo (**Figura 2**).



3. La celdilla se expone a un campo magnético, que atrae las PPM hacia los imanes. Mientras los imanes sostienen en su sitio las PPM, se eliminan la muestra y el reactivo no unidos a las PPM. De este modo la celdilla contiene EA unido al antígeno, unido a su vez a las PPM mediante el anticuerpo (**Figura 3**).



4. El sistema añade ácido (peróxido-ácido) y base (hidróxido de sodio) para iniciar la reacción quimioluminiscente. El sistema mide la emisión de luz en unidades relativas de luz (RLU). Cuando el sistema ha cuantificado la luz producida por la oxidación del EA, el sistema calcula la concentración del antígeno (**Figura 4**).



En un formato sandwich, la concentración de antígeno específico del analito de la muestra y la emisión de luz en las RLU tienen una relación directa. Si hay presentes en la muestra más moléculas de antígeno específicas del analito, hay presente más EA, por lo que la emisión de luz es mayor (Manual del usuario, ADVIA Centaur®, 2008).

1.6 CONTROL DE CALIDAD EN EL LABORATORIO CLÍNICO

Los laboratorios clínicos desempeñan un papel muy importante en el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de enfermedades, es por esto que los métodos analíticos que se aplican deben ser precisos, exactos y comparables con los de otros laboratorios. Así mismo debe tener como propósito esencial producir resultados de alta calidad y confiabilidad, garantizar que el proceso de medición sea exacto, confiable para el propósito por el cual es aplicado. Esta pretensión se puede lograr a través de un proceso documentado en el cual se planea una serie de actividades con el fin de controlar, detectar, minimizar, trazar, garantizar y asegurar que todos los procesos y procedimientos de medidas del laboratorio se estén ejecutando dentro de las especificaciones definidas para producir un resultado confiable. (Torres et al., 2007) La ISO 9004: 2009 define la calidad como *“El conjunto de especificaciones y características de un producto o servicio referidas a su capacidad de satisfacer las necesidades que se conocen o presuponen”*.

El concepto de control de calidad se ha expandido en los últimos años y actualmente se sustituye por el término de aseguramiento de la calidad como concepto más amplio que comprende todo el proceso, desde que se genera la petición analítica hasta que el resultado llega a manos del solicitante. El aseguramiento de la calidad es un conjunto de principios de funcionamiento que, si se cumplen estrictamente a lo largo de la toma y el análisis de la muestra, generan datos de calidad confiables y definibles. El sistema para el control de la calidad interna refleja objetivamente las variaciones en los resultados de las determinaciones, permite conocer cómo está funcionando el laboratorio, posibilita tomar decisiones oportunas, contribuye a aumentar la calidad de

las determinaciones, en otras. En la fase analítica se realizan las mediciones y observaciones en las diversas áreas que cubre el laboratorio. El propósito del control interno de la calidad en la fase analítica se define como *“Aquellos eventos o hechos propios del laboratorio que directa o indirectamente se relacionan con el procesamiento de la muestra”*, radica en inspeccionar diversos aspectos de los procedimientos analíticos que se llevan a cabo en el laboratorio, suministra una vigilancia continua del trabajo, y evalúa el resultado con el objetivo de decidir si los resultados son lo suficientemente confiables para ser emitidos (Torres et al., 2007; Rego et al., 2012).

“Calidad es mejorar continuamente, nunca des por sentado que está todo hecho y que te puedes dormir en los laureles..... Algunos laboratorios pueden carecer de la capacidad para obtener una formación adecuada en el control de la calidad. En otros laboratorios la sabiduría convencional está en que la calidad analítica ya no es más un problema, los laboratorios deberían enfocarse en la seguridad del paciente lo cual generalmente significa prestar atención a procesos pre-analíticos y post-analíticos, en lugar de procesos analíticos. Permítanme recordarles que no hay nada más peligroso para nuestros pacientes que unos resultados erróneos.

Ni médicos ni pacientes pueden tener un control adecuado de nuestros procesos de prueba para asegurarse que son correctos. Ellos dependen de nosotros, los laboratorios, para asegurarse que los números son exactos. Calidad analítica es, probablemente, aún más crítica hoy en día debido a que las pruebas a pacientes son realizadas por procesos de medición diferentes, en laboratorios diferentes y por personal con conocimientos de laboratorio diferentes.

Calidad es sinónimo de seguridad; nuestros esfuerzos deben en primer lugar evitar los problemas antes de que ocurran, pero en caso que ocurriesen, es primordial detectar los errores antes de poner en riesgo al paciente. En el mundo perfecto de las pruebas analíticas todos los problemas podrían ser evitados.

Desafortunadamente, aún no vivimos en ese mundo perfecto, continúan existiendo problemas analíticos con nuestros sistemas de medición y todavía prevalece la capacidad de detectar los problemas cuando ocurren.

Una de las técnicas más rentables para detectar el error, es el control estadístico de la calidad herramienta poderosa cuando está diseñada e implementada correctamente. Sin embargo, puede ser, en sí misma, un problema cuando está mal diseñada o aplicada inadecuadamente.... (Westgard, 2013, Prólogo a la edición Wallace Coulter).

La gestión de la calidad en laboratorios clínicos está sujeta a normas nacionales o internacionales de buenas prácticas de laboratorio, con el fin de apearse a los estándares de calidad y garantizar así la veracidad en los resultados. Cada país adopta alguna versión de las normas de calidad y competencia de la Organización Internacional para la Estandarización (International Organization for Standardization "ISO"), como son la ISO 9001: 2008 la cual considera los elementos de administración de la calidad y la ISO 15189: 2012, que lleva por título "*Laboratorios clínicos-Requisitos particulares para la calidad y la competencia*". Algunos países o regiones han adoptado diferentes nomenclaturas en México, la más reciente es una NMX-EC-15189: 2015 (Westgard, 2010).

La norma ISO 15189: 2012 surgió como una norma de referencia para aquellos laboratorios que realizan actividades de examen clínico y que pretenden demostrar:

a) Que operan un sistema de gestión eficaz y en mejora continua:

Se implementa un sistema de gestión que le permite administrar, controlar y utilizar la documentación del laboratorio, tanto administrativa (de gestión), como técnica (relacionada al examen en particular).

b) Que son técnicamente competentes:

Se demuestra competencia técnica del personal, instalaciones y condiciones ambientales adecuadas, métodos o procedimientos validados, equipo y

patrones confiables con trazabilidad a las unidades del Sistema Internacional de Unidades.

c) Que son capaces de producir resultados de examen confiables:

Se implementan programas de aseguramiento de la calidad de sus resultados, a fin de generar resultados técnicamente válidos. (Organismo Argentino de Acreditación, 2003)

Esta norma aplica para cualquier tipo de laboratorio clínico o médico, independientemente de su tamaño o actividad y se integra por una serie de requisitos agrupados en 2 secciones. La sección numerada en índice como capítulo “4” se enfoca a asegurar las cuestiones administrativas del laboratorio (que se caracteriza por su gran similitud con la norma ISO 9001); y en el capítulo “5” se orienta a los requisitos técnicos a cumplir, aquellos relacionados directamente con los exámenes del laboratorio como se encuentran enlistados a continuación en la **Tabla 1.** (ISO 15189, 2012)

TABLA 1. NORMA ISO 15189:2012	
4. Requisitos de gestión	5. Requisitos técnicos
4.1 Organización y responsabilidades de la dirección. 4.2 Sistema de gestión de calidad. 4.3 Control de documentos. 4.4 Contratos (o convenios) 4.5 Exámenes realizados por laboratorios subcontratados (derivados). 4.6 Adquisición de servicios y suministros clave. 4.7 Servicios de asesoría. 4.8 Atención de quejas. 4.9 Identificación y control de no conformidades. 4.10 Acciones correctivas. 4.11 Acciones preventivas. 4.12 Mejora continua. 4.13 Control de registros. 4.14 Evaluación y auditorías. 4.15 Revisiones realizadas por la dirección	5.1 Personal. 5.2 Instalaciones (planta física) y condiciones ambientales. 5.3 Equipo, reactivos y consumibles (fungibles) del Laboratorio. 5.4 Procesos de pre-examen. 5.5 Procesos de examen. 5.6 Aseguramiento de la calidad de los resultados. 5.7 Procesos post-examen. 5.8 Informe de resultados. 5.9 Emisión de resultados. 5.10 Gestión de información.

Esta norma acredita y demuestra, de manera objetiva e independiente, el compromiso de un laboratorio con la calidad y con la competencia técnica. Se demuestra así una garantía sobre el funcionamiento del laboratorio, un control sobre sus procesos, así como la capacidad para satisfacer los requisitos técnicos necesarios para asegurar una información vital para el diagnóstico clínico. Se ha adoptado esta norma como guía de referencia de las entidades acreditadoras para ejecutar los procesos de evaluación de laboratorios clínicos, por lo que es utilizada a nivel mundial para propósitos de acreditación. La acreditación es el resultado final de una evaluación (auditoría analítica) realizada por un equipo de evaluador (auditores), que tienen la experiencia, los conocimientos científicos y técnicos suficientes para verificar que los requerimientos establecidos en una normativa definida, se cumplan.

En México, la Entidad Mexicana de Acreditación A.C. (ema) es la primera entidad de gestión privada del país, que tiene como objetivo acreditar a los Organismos de la Evaluación de la Conformidad que son los laboratorios de ensayo, laboratorios de calibración, laboratorios clínicos, unidades de verificación (organismos de inspección) y organismos de certificación, Proveedores de Ensayos de Aptitud y a los Organismos Verificadores/Validadores de Emisión de Gases Efecto Invernadero (OVV GEI). (Consultores ACMS, 2015; ISO 15189, 2012; ema, 2008; Rodríguez y Blanco, 2001)

En el año 2008, en México, la EMA en colaboración con el Centro Nacional de Metrología (CENAM) y el Fondo de Apoyo para la Micro, Pequeña y Mediana Empresa (FONDO PYME), llevaron a cabo la elaboración de la *“Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico”* con la finalidad de aportar criterios técnicos que sirvan de apoyo a los usuarios, para asegurar la confiabilidad y validez técnica de sus resultados. (ema, 2008)

1.7 VALIDACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS DE EXAMEN

Generalmente existen varios métodos analíticos disponibles para la medición de un analito en un tipo específico de muestra, por lo que es importante que el laboratorio

usuario de la metodología evalúe los diferentes métodos y seleccione aquel que mejor se adecue a las necesidades y recursos. La realización de las actividades de validación y verificación de los procedimientos de examen utilizados por el propio laboratorio, contemplan la satisfacción de las necesidades metrológicas requeridas por el médico para un adecuado tratamiento del paciente. Un laboratorio clínico acreditado o en proceso de acreditación debe demostrar que tiene competencia técnica para realizar las actividades de validación y verificación de los procedimientos de examen cuantitativo establecidos en su alcance de acreditación. La validación, que se define como *“La confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos del método para una utilización o aplicación específica prevista”*, comprueba la aptitud de los procedimientos de examen y refleja las condiciones reales de la aplicación de los mismos. Los datos de esta validación los informa el fabricante en los instructivos de uso de los reactivos tales como (EMA, 2008):

- Linealidad (intervalo analítico)
- Precisión
- Veracidad
- Límite de detección
- Selectividad
- Sensibilidad analítica
- Intervalo de trabajo
- Especificidad analítica
- Incertidumbre

Si la información no se encuentra completa en los insertos el laboratorio debe presentar evidencia documentada y actualizada de que la ha solicitado al fabricante. No obstante, el laboratorio debe verificar que puede aplicar correctamente los métodos ya validados por el fabricante, previo a su uso en los exámenes, bajo sus propias condiciones de operación (equipo, calibradores, analistas, etc.) generando evidencias objetivas para confirmar su correcta aplicación. Antes de realizar la validación y/o verificación en la rutina del laboratorio debe llevarse a cabo la calibración analítica de los equipos. La validación y/o verificación de un procedimiento de examen depende de

los cambios realizados, por lo que debe repetirse cuando existan cambios mayores entre los cuales están el cambio de equipo y mantenimiento mayor del mismo, entre otros. (ema, 2008)

Así también, en el caso de realizar modificaciones a métodos establecidos o ya validados por el fabricante o cuando se utilicen métodos desarrollados por el propio laboratorio (internos), éste debe realizar la validación completa del método y presentar las evidencias correspondientes, incluyendo el procedimiento que utilizó para realizarla. (ema, 2008)

1.7.1 VERIFICACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE DESEMPEÑO DE LOS PROCEDIMIENTOS DE EXAMEN

Verificar consiste en evaluar el desempeño del método para demostrar que cumple con los requisitos que fueron especificados por el fabricante como resultado de su validación. Es por este motivo que cada laboratorio debe realizar la verificación de los procedimientos de examen seleccionados antes de ponerlos en uso y evidenciar si éstos cumplen con las características de desempeño bajo las propias condiciones del laboratorio. La verificación también se debe realizar cada vez que se realice un cambio mayor en algún procedimiento de examen que ya hubiera sido verificado anteriormente.

Existen diferentes documentos y protocolos internacionales escritos por el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (**VER ANEXO B**), en los cuales brindan los lineamientos necesarios para llevar a cabo la validación y/o verificación de un equipo. En la “Guía para la validación y la verificación *de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico*” propuesta por la EMA, especifica, los siguientes cuatro parámetros para verificar un método:

- Linealidad (intervalo analítico)
- Precisión
- Veracidad
- Incertidumbre

Si el laboratorio considera que alguno de los parámetros para la verificación de los procedimientos de examen no aplica en función al método seleccionado, esa decisión debe ser justificada técnicamente (ema, 2008).

1.7.2 PARÁMETROS DE DESEMPEÑO DE LOS PROCEDIMIENTOS DE EXAMEN

Para poder llevar a cabo la verificación de los procedimientos de examen es necesario conocer cada uno de los parámetros a evaluar.

A) Linealidad

El término linealidad aplicado a un método analítico se refiere al rango de concentraciones del analito en el que la respuesta del sistema de medición es una función lineal de la concentración; la representación gráfica de este rango (concentraciones frente a respuesta) debe exhibir una buena aproximación de los puntos experimentales a la recta de regresión para que el método analítico en cuestión sea aceptable (NMX-CH-152-IMNC-2005).

Es importante evaluar dentro del intervalo analítico de los procedimientos de medición implementados por un laboratorio los resultados máximo y mínimo que pueden ser reportados. Los fabricantes emiten valores para la linealidad (el intervalo reportable), por lo que es necesario confirmar mediante el suministro de evidencia objetiva que los valores reportados por el laboratorio utilizando dicho procedimiento de medición muestran un comportamiento lineal. (NCCLS, 2003)

El experimento de linealidad involucra una serie de muestras de concentración conocida o una serie de diluciones conocidas de muestras altamente concentradas, las mediciones o los valores de las pruebas reportadas son comparados con los valores asignados o los valores de dilución. La linealidad es obtenida al trazar la mejor línea recta que toque la mayor cantidad de puntos. La pendiente deseable deber ser de 1 y la ordenada al origen 0, finalmente se compara el sesgo (desviación) o el

porcentaje de error para cada dilución con el error permitido para la prueba de acuerdo con la información del fabricante o del método, donde el sesgo (desviación) y porcentaje de error deben ser menores que el error permitido. Una vez obtenidos estos datos se deberá decidir si la linealidad se acepta o se rechaza. Debe considerarse que dicha verificación debe tocar los puntos de decisión clínica, entendiéndose éstos como las concentraciones o actividades de los analitos donde el médico decide entre administrar o no algún tratamiento terapéutico (ema, 2008).

B) Exactitud

La “exactitud” expresa la cercanía de un resultado al valor verdadero. La verificación de un método busca cuantificar la exactitud probable de los resultados evaluando tanto los errores sistemáticos como los aleatorios sobre los resultados (Westgard, 2008).

Los errores cometidos en el laboratorio de diagnóstico se clasifican de la siguiente manera:

- a) **Aleatorios:** Varían de forma impredecible en magnitud y signo, se relaciona con la precisión del procedimiento de medición. Estos errores difieren en cualquier sentido del valor medio y afectan la reproducibilidad. (Rego et al., 2012; Westgard, 2008)

- b) **Sistemáticos:** Son errores que permanecen constantes cuando las mediciones se realizan bajo las mismas condiciones, se relaciona con la veracidad del procedimiento de medición. Pueden existir varias fuentes de error sistemático, siendo algunos errores positivos y otros negativos, la suma de todos ellos se conoce como error sistemático total o sesgo de la medición. (Rego et al., 2012; Westgard, 2008)

Los errores aleatorios y sistemáticos pueden ocurrir independientemente unos de otros y surgir en diferentes etapas del procedimiento. El error aleatorio es más fácil de detectar que el sistemático, ya que el segundo no se puede apreciar con la sola repetición de mediciones y, a menos que se conozca de antemano el valor verdadero del mensurando, podrían existir errores sistemáticos muy grandes, que pasen

inadvertidos. Es por esto que, con el propósito de mejorar la calidad de su desempeño, los laboratorios deben implementar programas de control interno y someterse a una evaluación externa de la calidad. Todos los laboratorios deben llevar a cabo simultáneamente esas dos actividades complementarias para poder garantizar una calidad analítica aceptable. El control interno significa el seguimiento infalible e inmediato de cada prueba con el fin de garantizar la repetibilidad diaria de los resultados y asegurar que son lo suficientemente confiables para ser divulgados (evalúa precisión). Mientras que la evaluación externa de la calidad se refiere al seguimiento de los resultados de las pruebas por un organismo externo que verifica el desempeño de cada laboratorio y la comparabilidad de resultados entre laboratorios (evalúa veracidad) (Fink et al., 1997; EMA, 2008).

B.1) Precisión

La precisión es una medida de que tan cercanos están los resultados unos con respecto a los otros y por lo general se expresa mediante medidas de desviación estándar (DE) la cual describe la dispersión de los resultados. (Westgard, 2008) Para evaluar la precisión el laboratorio deberá aplicar alguna de las siguientes opciones:

- a) Realizar el examen de un material (muestras de pacientes, muestras control, etc.) de valor conocido o no, analizado por lo menos 20 veces en forma continua, llamado intraserial o intracorrida o 20 veces en el transcurso del día (24 h) llamado intradía.
- b) Utilizar 20 valores obtenidos uno cada día de la misma muestra de un paciente o bien obtenidos de una curva de un programa de control de calidad interno de 20 días diferentes con el mismo lote (interserial o intercorrida). (ema, 2008)

En ambos casos se debe calcular la media (\bar{X}), la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación expresado en porcentaje (%CV) y la varianza (s^2). La

precisión del método obtenida por el laboratorio debe ser menor o igual a la precisión del método que proporciona el fabricante. En caso de que sea mayor, el laboratorio deberá presentar la justificación estadística documentada de que no existe una diferencia significativa. La prueba F es apropiada para evaluar la precisión considerando una distribución normal. (ema, 2008)

B.2) Veracidad

La veracidad de un método es una expresión de que tan cercana se encuentra la media de un conjunto de resultados (producidos por el método) respecto del valor real. La veracidad se relaciona con la presencia de errores de tipo sistemático, también llamado “sesgo” o “desviación”; que puede expresarse como un valor absoluto o relativo al valor verdadero. (ema, 2008)

La evaluación práctica de la veracidad se fundamenta en la comparación de la media de los resultados de un método con relación a valores conocidos, es decir, la veracidad se determina contra un valor de referencia. (CENAM, 2005)

Para verificar la veracidad de los métodos de examen cuantitativos que se emplean en el laboratorio clínico, se pueden utilizar las siguientes herramientas:

I. Valoración de un material de referencia.

Se utiliza un material de referencia certificado (MRC), un material de referencia (MR), un calibrador o un suero con un valor conocido del analito, considerado el valor asignado a éste como el valor verdadero.

a. Valoración por el cálculo del error relativo:

El cálculo del porcentaje de error relativo se puede estimar mediante el cálculo inicial de la media aritmética, la desviación estándar y el coeficiente de variación de una muestra de suero usada, aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de error relativo} = \left[\frac{(\text{Valor real} - \text{Media de la medición})}{\text{Valor real}} \right] \times 100$$

Entre menor sea el porcentaje de error relativo mayor será la veracidad del método. El criterio de aceptabilidad es que el valor del error relativo sea menor o igual al reportado por el fabricante del equipo.

b. Valoración por el cálculo de porcentaje de recuperación

El material se somete a examen 10 veces y se estima la concentración media del analito y con el valor obtenido se puede determinar el porcentaje de recuperación, aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ recuperación} = \left[\frac{\text{Valor obtenido}}{\text{Valor de referencia}} \right] \times 100$$

El porcentaje de recuperación tiene que ser igual o lo más cercano a 100. Valores menores indican menor cantidad recuperada del analito cuantificado y a mayor porcentaje mayor cantidad del analito recuperado.

El criterio de aceptación es que el valor sea menor o igual al reportado por el fabricante del instrumento.

II. Estudios de comparación de métodos.

III. Estudios de comparación interlaboratorios con base en los resultados de programas de ensayos de aptitud. (ema, 2008)

C) Incertidumbre

Es un parámetro asociado al resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente, ser atribuidos al mensurando. Es un parámetro único que expresa el intervalo de posibles valores sobre la base de los

resultados de medición. Una estimación de la incertidumbre de medición considera todos los efectos reconocidos que influyen en el resultado; las incertidumbres asociadas a cada efecto son combinadas de acuerdo a procedimientos bien establecidos. (CENAM, 2005) La estimación de la incertidumbre del resultado final de medición deberá considerar las contribuciones de incertidumbre significativas y que no se encuentren incluidas en el diseño de la validación. Por ejemplo, preparación del paciente, muestreo, tipo de matriz, preparación de la muestra, entre otras.

Para la estimación de la incertidumbre, el laboratorio procederá de la siguiente manera, según sea el caso:

- a) **Caso A**, se deberán considerar por lo menos la incertidumbre proveniente del material de referencia (calibrador, ajustador, material de referencia certificado) y la incertidumbre de la medición (datos de repetibilidad, datos del control diario y precisión intermedia).
- b) **Caso B**, si se cuenta con los datos de las mediciones de control de calidad interno se debe proceder como en el caso a y si no se cuenta con información de la concentración y la incertidumbre del material de calibración se debe considerar únicamente la contribución de la incertidumbre de la medición. Por ejemplo, cuando se utilizan calibradores electrónicos o ajustadores fotométricos.
- c) **Caso C**, en los programas formales de comparación interlaboratorio, es común que el organizador informe un valor de índice de desviación (ID) o una puntuación del índice de varianza (PIV), este dato será empleado para calcular el error cuadrático medio (ECM) que corresponde al valor de la incertidumbre de la medición. En caso de no existir dichos programas, el intercambio de muestras con otros laboratorios será válido. (ema, 2008)

Para la estimación de la incertidumbre según el “caso A”, debe considerar los siguientes puntos:

- I. Incertidumbre típica relativa del valor asignado al material de referencia certificado, corresponde a la incertidumbre estándar.
- II. Incertidumbre estándar relativa dada por la precisión interdiaria.
- III. El cálculo de la incertidumbre estándar combinada, a partir de los cálculos de las incertidumbres estándares.
- IV. Finalmente se calcula la incertidumbre expandida con el porcentaje del nivel de confianza seleccionado. (EMA, 2008)

1.8 TRASLADO DE LÍMITES DE REFERENCIA

Los límites de referencia deberían ser producidos por los mismos laboratorios de análisis clínicos ya que la población de análisis es particular para cada laboratorio. Sin embargo, estos valores pueden ser producidos en otros laboratorios, descritos en la literatura o bien en el inserto que acompaña a los reactivos, en cualquiera de los casos, es obligación de cada laboratorio comprobar que tales valores se ajustan a la población que atiende (CLSI, 2010).

Un valor de referencia se define como el resultado analítico obtenido en un individuo de referencia. Este individuo es una persona que pertenece a la comunidad a la que sirve el laboratorio en cuestión y que se caracteriza fundamentalmente por disfrutar de un estado de salud definido por el propio investigador, no un estado de salud “absoluto”. Todos los individuos que cumplan las condiciones de inclusión definidas por el investigador, constituyen la población de referencia (SEQC, 2012).

El número de personas que integran la población de referencia suele ser inmenso y por lo tanto, imposible de obtener. Por esta razón, se recurre a la teoría estadística del muestreo, donde generalmente son necesarios mínimo 120 sujetos; sin embargo el documento “*Defining, establishing and verifying reference intervals in the clinical laboratory*” del CLSI, C28-A3c; en la sección 11.2 propone un traslado de intervalos (límites) de referencia que se lleva a cabo con una muestra de 20 personas de referencia, las cuales tendrán que cumplir con los criterios de inclusión y exclusión mismos que fueron establecidos de acuerdo a las limitaciones especificadas en el

inserto de cada prueba. La muestra conformará un grupo representativo de la población de referencia en la que se realizarán las determinaciones analíticas y con los datos obtenidos se inferirán los parámetros de la población. Si de estas 20 personas, el 10% sobrepasara el límite de referencia; se seleccionarían otras 20 personas y se realizaría nuevamente el análisis. Si se cumple el criterio establecido por la guía, se acepta el traslado de límites de referencia en la población de interés (CLSI, 2010).

2. ANTECEDENTES

Plebani y Lippi en 2009, demostraron la importancia de la medición de HER-2/*neu* en suero mediante inmunoensayos en el equipo ADVIA Centaur®, para el seguimiento y supervisión del cáncer de mama metastásico, ofreciendo varias ventajas en términos de estandarización, automatización, rendimiento, precisión y exactitud.

La ISO 15189: 2012 especifica que “Los procedimientos de examen validados utilizados sin modificaciones se deben someter a una verificación independiente por parte del laboratorio antes de ser introducidos en el uso de rutina”.

El Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) recomienda que *"Antes de usar un nuevo método o equipo en el diagnóstico in vitro, el laboratorio debe evaluar su aceptabilidad"* y la legislación estadounidense para los laboratorios (Clinical Laboratory Improvement Amendments -CLIA-) indica que *"El laboratorio debe verificar las especificaciones de desempeño del fabricante, dadas en el inserto del reactivo para cada prueba nueva antes de emitir los resultados de los estudios de los pacientes"*.

Chávez et al. en 2009 llevaron a cabo la evaluación del desempeño analítico del equipo hematológico Medonic CA 530 Thor (Boule Medical AB, Suecia), enfocado a características como precisión, exactitud y linealidad, basándose principalmente en los protocolos del CLSI concluyendo que el equipo es adecuado para su uso en el laboratorio y cumple los requisitos de validación.

3. JUSTIFICACIÓN

El equipo ADVIA Centaur® (Siemens, USA) es un instrumento completamente automatizado de inmunoensayo para laboratorios de volumen medio, es fácil de manejar, aumenta la eficiencia y flujo de trabajo, ofrece excelente sensibilidad y especificidad esperada de la tecnología de quimioluminiscencia directa. El equipo permite que su laboratorio proporcione un excelente cuidado al paciente al traer una amplia gama de inmunoensayos a un solo puesto de trabajo, incluyendo enfermedades infecciosas y HER-2/*neu* sérico. En particular, se ha demostrado que el HER-2/*neu* sérico es un marcador tumoral útil en el monitoreo en tiempo real de un tipo específico de cáncer de mama metastásico, siempre que se obtengan resultados confiables y con utilidad clínica probada. Por lo anterior, es necesario demostrar el buen desempeño analítico del método para medir HER-2/*neu* sérico, en el equipo ADVIA Centaur® y de este modo estar en condiciones de implementarlo a mediano plazo en el área de Marcadores Tumorales del Laboratorio Clínico del Instituto Nacional de Cancerología como complemento de las técnicas habituales de diagnóstico.

4. HIPÓTESIS

El desempeño del ensayo HER-2/*neu* en el equipo ADVIA Centaur, cumplirá con los requisitos establecidos en la guía de la ema, para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el Laboratorio Clínico.

5. OBJETIVO GENERAL

Verificar, mediante la “*Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico*” propuesta por la ema, el desempeño analítico del equipo ADVIA Centaur para la determinación cuantitativa de HER-2/*neu*.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

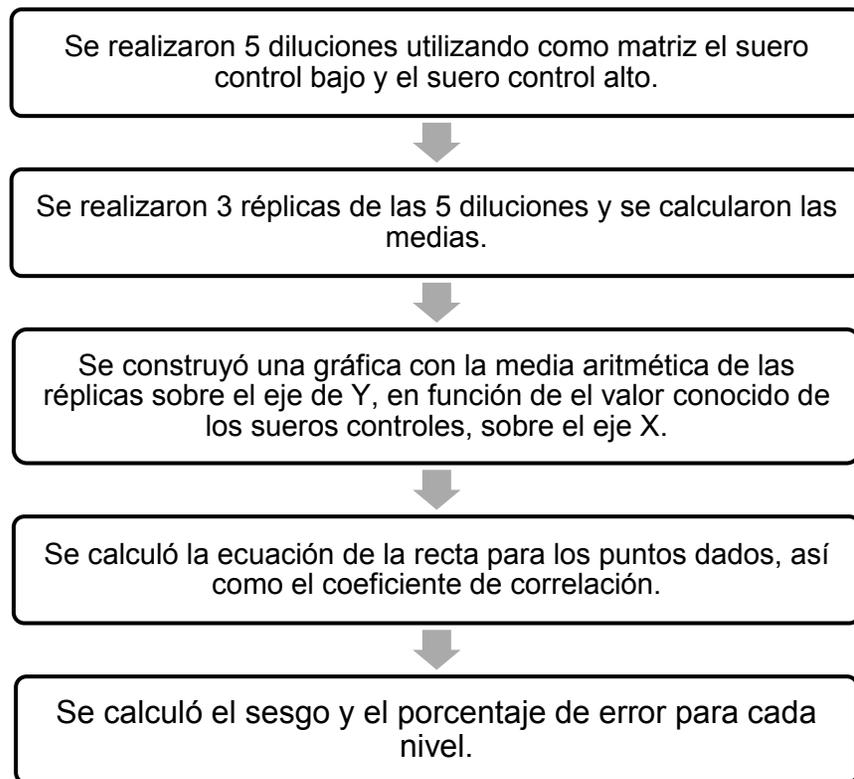
- Evaluar la linealidad, precisión, veracidad e incertidumbre del intervalo analítico de medición del HER-2/*neu* en el equipo ADVIA Centaur.
- Llevar a cabo el traslado de límites de referencia obtenidos del inserto a nuestra población, para la prueba HER-2/*neu* en el equipo ADVIA Centaur® según la guía C28-A3c del CL

6. MATERIAL Y MÉTODOS

- Equipo ADVIA Centaur (Siemens, USA).
- Calibradores H2n bajo, para el uso diagnóstico *in vitro* en equipo ADVIA Centaur cada vial contiene 2 ml de HER-2/*neu* en suero bovino con azida sódica (< 0.1%) con una concentración de 14.5 ng/ml, número de lote C4230L.
- Calibradores H2n alto, para el uso diagnóstico *in vitro* en equipo ADVIA Centaur cada vial contiene 2 ml de HER-2/*neu* en suero bovino con azida sódica (< 0.1%) con una concentración de 100 ng/ml, número de lote C4230H.
- Controles H2n Nivel 1 (Bajo) número de lote K4207861 y Nivel 2 (Alto) número de lote K4207862, para el uso diagnóstico *in vitro* en equipo ADVIA Centaur para evaluar el control de calidad interno.

- Suero control alto, el suero se obtuvo de una paciente con cáncer de mama metastásico, la cual tuvo un valor de 258.9 ng/ml.
- Suero control bajo, el suero se obtuvo de un sujeto normal, tuvo un valor de 258.9 ng/ml (elegido al azar de los 25 aceptados para el traslado de intervalo de referencia).
- 25 sueros de sujetos sanos para evaluar el traslado de límites de referencia.
- “Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico” propuesta por la (ema, 2008).

6.1 Linealidad (ema, 2008):



6.2 Precisión (ema, 2008):

Se realizaron 20 mediciones intradía del calibrador alto.



Se calculó la media aritmética, la desviación estándar (DE), el coeficiente de variación (%CV) y la varianza (s^2).

6.3 Veracidad (ema, 2008):

Se realizaron 10 mediciones intraserales del calibrador alto.

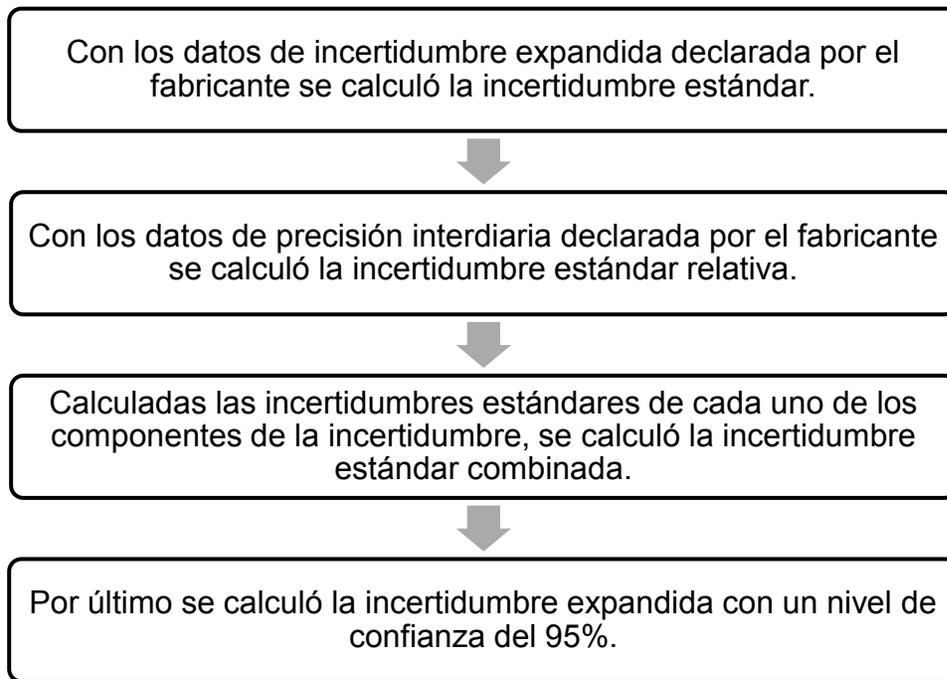


Se calculó la media aritmética (\bar{X}), la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (%CV).

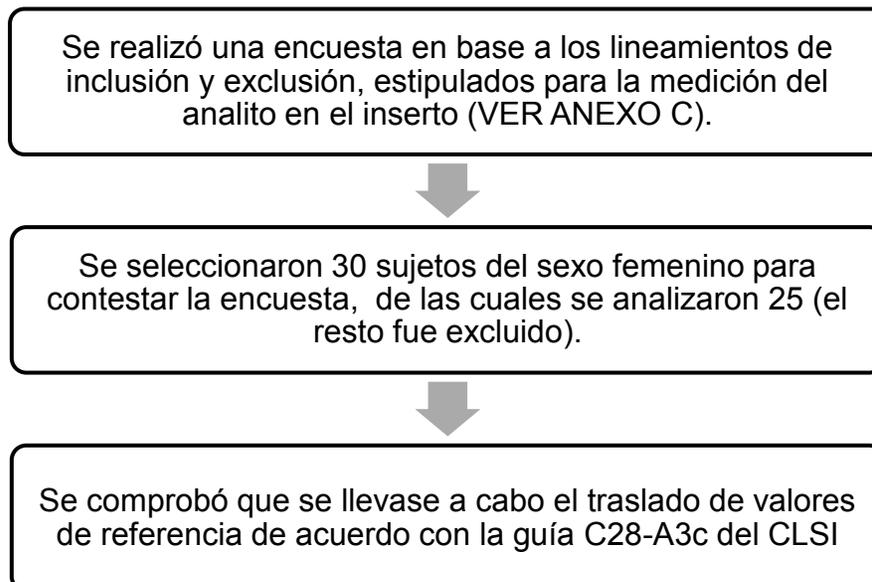


Se realizó el cálculo del error relativo y el porcentaje de recuperación

6.4 Incertidumbre (ema, 2008):



6.5 Traslado de valores de referencia (C28-A3c del CLSI):



Para elegir a nuestra población de referencia, se realizó una encuesta en la que tenían que cumplir con los siguientes criterios (**ver anexo C**):

a) Inclusión:

- Ser mujer de entre 24 hasta 74 años.
- Hacer ejercicio regularmente.
- Nulípara o multípara.
- No estar embarazada.
- No estar lactando.

b) Exclusión:

- Ser fumadora.
- Haber padecido cáncer de mama o tener familiares directos con esta enfermedad.
- Ser diabética, hipertensa o con algún otro padecimiento.
- Con tratamientos hormonales.
- Tomar bebidas alcohólicas

7. RESULTADOS

7.1 LINEALIDAD

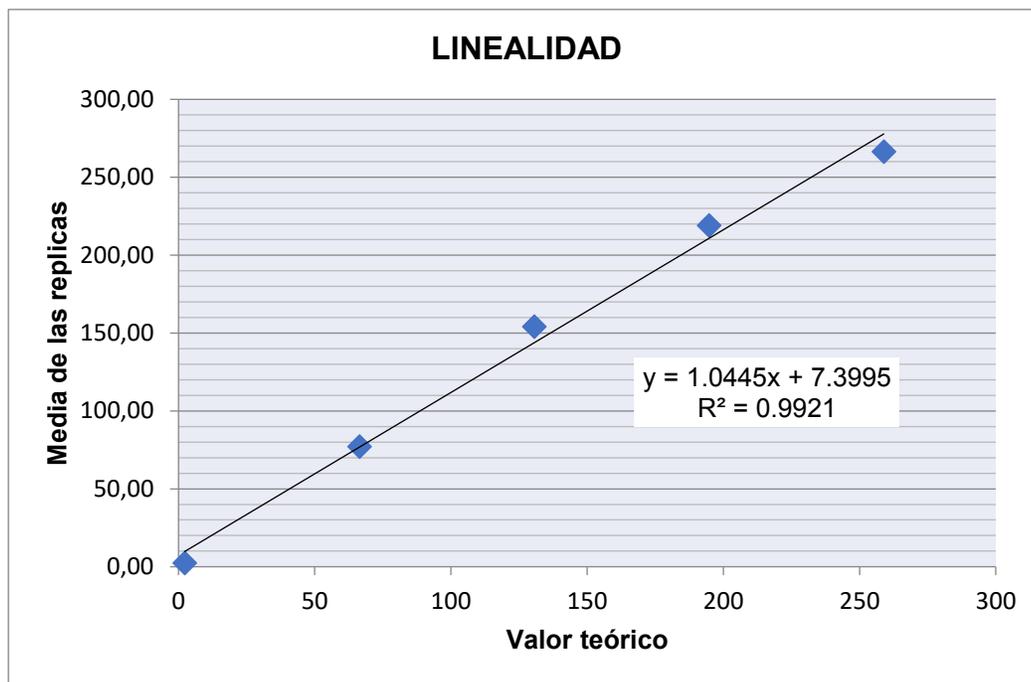
La concentración alta (suero control alto, en nuestro caso) debe abarcar al menos $\frac{2}{3}$ de la sensibilidad y rango de ensayo que informa el fabricante (0.5–350 ng/ml). Por lo que el suero control bajo (M_1) tuvo una concentración de 2.26 ng/ml, mientras que el suero control alto (M_2) de 258.9 ng/ml. Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 2**.

TABLA 2. RESULTADO DE RÉPLICAS, MEDIAS Y VALOR TEÓRICO

Número de dilución	Porcentaje de dilución en función de M_2	Resultados de las concentraciones por cada réplica			Media de las réplicas (Y) (ng/ml)	Valor teórico (X)
		1	2	3		
1	0%	1.9	2.6	2.5	2.33	2.26
2	25%	76.6	76.5	78.2	77.10	66.42
3	50%	153.7	157.1	151.4	154.07	130.58
4	75%	216.3	226.8	213.8	218.97	194.74
5	100%	226.5	289.8	283.1	266.47	258.9

Se construyó la gráfica con la media aritmética de las réplicas sobre el eje Y, en función de la concentración conocida sobre el eje X; se calculó la ecuación de la recta para los puntos dados y el coeficiente de correlación.

El criterio de aceptación que indica la guía de la EMA es que la pendiente de la gráfica debe ser lineal, con un coeficiente de correlación de por lo menos 0.99; como se puede observar en la gráfica correspondiente (**Gráfica 1**), el valor obtenido es de 0.992, por lo tanto, se acepta la linealidad del ensayo para *Her-2/neu*.



Gráfica 1. Medias vs Valores Teóricos

7.2 PRECISIÓN

La concentración del calibrador H2n alto es de 100 ng/ml, se realizaron 20 réplicas intradía. Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 3**.

TABLA 3. RESULTADOS Y CÁLCULO DE PRECISIÓN REPORTADA POR EL FABRICANTE

No. RÉPLICA	CONCENTRACIÓN
1	100.10
2	98.30
3	97.30
4	101.20
5	99.30
6	97.80
7	87.30
8	102.00
9	92.90

10	95.90	
11	102.50	
12	102.50	
13	107.20	
14	99.60	
15	103.00	
16	100.50	
17	88.40	
18	97.70	
19	103.40	
20	88.70	
	OBTENIDA	FABRICANTE
MEDIA:	98.28	113.40
DE:	5.35	3.67
%CV:	5.44	3.2
VARIANZA:	28.59	13.47

Debido a que la media y la desviación estándar obtenida es mayor a la del fabricante se realizó la prueba de significancia estadística F para comparar las varianzas y saber si esta diferencia es significativa o si se acepta. Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 4**.

TABLA 4. RESULTADOS DE LA PRUEBA F

	OBTENIDA	FABRICANTE
DE:	5.35	3.67
VARIANZA:	28.59	13.47
F calculada:	2.12	
F crítica:	2.16	

7.3 VERACIDAD

La concentración del calibrador H2n alto es de 100 ng/ml, se realizaron 10 réplicas intradía. Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 5**.

TABLA 5. CÁLCULO DEL ERROR RELATIVO Y PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN

No. RÉPLICA	CONCENTRACIÓN
1	102.50
2	102.50
3	107.20
4	99.60
5	103.00
6	100.50
7	88.40
8	97.70
9	103.40
10	88.70
MEDIA	99.35
DE	6.22
%CV	6.265
PORCENTAJE DE ERROR RELATIVO	0.65
PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN	99.35

Características proporcionadas por el fabricante en el inserto:

- a) **Recuperación con dilución:** Oscilan entre 84% y el 106%, con una media del 96%.
- b) **Recuperación con enriquecimiento:** Oscilan entre 88.7% y el 100.9%, con una media del 95.3%.

7.4 INCERTIDUMBRE

El cálculo de incertidumbre de la medición del valor del calibrador, estipulada en la carta de trazabilidad del fabricante fue la siguiente:

- Concentración del calibrador: 100 ng/ml
- Incertidumbre: 4.5 % con un intervalo de confianza del 95%

- El factor de cobertura (k) para un intervalo de confianza del 95% es 2.
 - **Por lo que la incertidumbre estándar es decir la incertidumbre del calibrador, es de 2.25 ng/ml.**

Cálculo de precisión interdiaria:

Con los datos obtenidos de la precisión, se realizó el cálculo:

- Concentración del calibrador: 98.28 ng/ml
- CV: 5.44%
 - **Por lo que la incertidumbre estándar relativa es de 5.3 ng/ml es decir, la desviación estándar del proceso.**

Una vez calculadas las incertidumbres estándares de cada uno de los componentes de la incertidumbre, se calculó la incertidumbre estándar combinada (u_c) con la siguiente fórmula, obteniendo:

$$u_c = \sqrt{(2.25)^2 + (5.3)^2}$$

$$u_c = 5.75 \text{ ng/ml}$$

Por último, se calculó la incertidumbre expandida (U) con un nivel de confianza del 95%:

$$U = u_c \times k$$

$$U = 5.75 \text{ ng/ml} \times 2$$

$$U = \pm 11.5 \text{ ng/ml}$$

7.5 TRASLADO DE LÍMITES DE REFERENCIA

Después de aplicar las 30 encuestas y seleccionar a los 25 sujetos, se analizaron los sueros correspondientes. Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 6 y 7**.

TABLA 6. RESULTADOS POR EDADES Y SUJETOS

SUJETOS	EDAD	RESULTADO (ng/ml)
1	24	11.3
2	31	12.6
3	28	15
4	49	10.7
5	49	15
6	26	8.5
7	38	10.1
8	47	11.2
9	46	11.5
10	38	12.3
11	24	9.6
12	67	11.1
13	58	14.8
14	49	8.8
15	48	8.6
16	45	14.1
18	45	10.6
19	38	9.6
20	42	11.2
21	45	9.8
22	35	11.9
23	74	13.4
24	57	13.5
25	47	10.8

TABLA 7. MEDIAS DE SUJETOS POR RANGOS DE EDAD

EDADES	SUJETOS	MEDIA (ng/ml)
20-30	4	11.1
31-40	5	11.3
41-50	11	11.12
50-60	3	14.57
61-70	1	11.10
Mayor de 71	1	13.4

El valor de referencia del inserto y bibliográfico es menor o igual 15 ng/ml, como se puede observar en ninguno de los 25 sujetos se observó un resultado de Her-2/*neu*

sérico por arriba del límite de referencia del inserto (15 ng/ml), por lo que según la guía del CLSI C28-A3c es posible el traslado de dicho límite de referencia a la población que recibe el Instituto Nacional de Cancerología.

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la **Tabla 2** se observan los resultados de las medias obtenidas al graficarlas con respecto al valor teórico calculado, las cuales presentan una tendencia lineal con un coeficiente de correlación de 0.992 (**Gráfica 1**). Jhang et al, en 2004 afirman que, en los experimentos de linealidad, el valor ideal de la pendiente debe ser 1, por otra parte, la guía de la ema, menciona que por lo menos se debe obtener un coeficiente de correlación del 0.99, por lo que el resultado obtenido cumple con los criterios de aceptabilidad.

En la **Tabla 3** podemos observar que la media obtenida de las 20 réplicas para el cálculo de precisión fue de 98.28 ng/ml, siendo menor con respecto a la obtenida por el fabricante de 113.40 ng/ml. En cuanto a la desviación estándar y el coeficiente de variación obtenidos fue de 5.35 y 5.44% respectivamente, fueron mayores a las informadas por el fabricante 3.67 y 3.2%. Según la guía de la ema la precisión del método obtenida por el laboratorio debe ser menor o igual a la precisión del método que proporciona el fabricante, sin embargo; en caso de que sea mayor, el laboratorio deberá presentar la justificación estadística documentada de que no existe una diferencia significativa para llevar a cabo lo siguiente la guía de la ema propone aplicar el test de significancia estadística F el cual es apropiado para evaluar la precisión considerando una distribución normal ver **Tabla 4**. Se obtuvo una F crítica de 2.16 y una F calculada de 2.12 para poder afirmar que no existe una diferencia estadística significativa la F calculada tiene que ser menor que la F crítica, por lo que afirmamos que no existe una diferencia significativa y se acepta el parámetro de precisión.

En cuanto al parámetro de veracidad, se observa en la **Tabla 5**, un porcentaje de error relativo de 0.65%, la guía afirma que entre menor sea este porcentaje mayor será la veracidad del método. Este porcentaje no lo informa el fabricante; sin embargo, sí menciona los porcentajes de recuperación. La recuperación con dilución varía entre 84% y el 106% con una media del 96%, mientras que la recuperación con

enriquecimiento se reporta entre el 88.7% y el 100.9%, con una media del 95.3%. El porcentaje de recuperación obtenido en la verificación fue de 99.35%, según la guía de la ema el valor debe ser igual o lo más cercano a 100%, por lo que se cumple éste criterio.

En lo que respecta al valor obtenido de incertidumbre expandida del ensayo, esta es de ± 11.5 ng/ml, lo cual nos indica que en un resultado reportado existe un 95% de probabilidad de que el valor verdadero se encuentre en este rango de valores. Por ejemplo, un valor reportado de 100 ng/ml con ± 11.5 ng/ml de incertidumbre, indica que existe un 95% de probabilidad de que el valor se encuentre entre 88.5 hasta 111.5 ng/ml.

Con respecto al traslado de límites de referencia, después de examinar las medias obtenidas de acuerdo a los rangos de edades **Tabla 7** se observa que los 25 sujetos de estudio e independientemente de la edad presentaron niveles de HER-2/*neu* menores a 15 ng/ml, tal y como lo indica la literatura y el inserto del fabricante (Esteva et al, 2005; Won y Han, 2012). Los resultados obtenidos confirman que es posible emplear los límites de referencia establecidos en el inserto en la población del Instituto Nacional de Cancerología sin necesidad de realizar un estudio de mayor magnitud para establecer límites de referencia propios.

9. CONCLUSIONES

Basándose en los protocolos estipulados en la “Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico” (ema, 2008). Los resultados obtenidos indican que la determinación cuantitativa de HER-2/*neu* en el equipo ADVIA Centaur es adecuado para su uso en el laboratorio y satisface los requerimientos de calidad establecidos.

El límite de referencia menor o igual a 15 ng/ml es trasladable en función de la población a la que presta sus servicios el Instituto Nacional de Cancerología.

10. BIBLIOGRAFÍA:

1. Altekruse S, Kosary C, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Ruhl J, Howlander N, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner M, Lewis D, Cronin K, Chen H, Feuer E, Stinchcomb D, Edwards B. Cancer Statistics Review, 1975-2007, National Cancer Institute. Bethesda, MD; 2010.
[Fecha de acceso 22 de agosto de 2015] URL disponible en:
http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007
2. American Cancer Society. Global Cancer Facts & Figures. 3rd Edition. 2015.
3. Cardoso F, Harbeck N, Fallowfield L, Kyriakides S, Senkus E. Locally recurrent or metastatic breast cancer: ESMO Clinical Practice Guide lines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2012; 23:vii11-9.
4. Carney W. Circulating oncoproteins HER-2/neu, EGFR and CAIX (MN) as novel cancer biomarkers. Expert Rev. Mol. Diagn. 2007; 7(3), 309-319.
5. Carney W. HER2/neu Status is an Important Biomarkerin Guiding Personalized HER2/neu Therapy. Cambridge, Connection 9:2006.
6. Centro Nacional de Metrología (CENAM), Métodos analíticos adecuados a su propósito; Guía de laboratorio para la validación de métodos y Temas relacionados, Segunda Edición, México, 2005.
7. Chavéz L, López S, Barlandas E, Armenta A. Evaluación del desempeño analítico del equipo hematológico Medonic CA 530 Thor.Medigraphic Bioquimia Volumen 34 No 2. 2009. pp. 69-76.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Second Edition, Document C28-A2. USA, 2000.
9. CLSI. “*Defining, establishing and verifying reference intervals in the clinical laboratory*” C28-A3c. 3ra edición. 2010.

10. Cultek. Fundamentos y tipos de ELISAs. 2006. pp 7. [Fecha de acceso 29 de octubre de 2016] URL disponible en: <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-ELISA-protocolos.pdf>
11. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15 year survival: an overview of the randomised trials. Lancet. 2005; 365: 1687-1717.
12. Entidad Mexicana de Acreditación A.C. Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico, 2008. [Fecha de acceso 6 de julio de 2015] URL disponible en: <http://200.57.73.228:75/pqtinformativo/GENERAL/Clinicos/Carpeta 2 Criterios evaluacion/CLINICOS Validacion-Verificacion.pdf>
13. Estava F, Cheli C, Fritsche H, Fournier M, Slamon D, Thiel R, Luftner D, Ghani F. Clinical utility of serum HER-2/neu in monitoring and prediction of progression-free survival in metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab-based therapies. Breast Cancer Research, 2005; Vol 7: R436-R443.
14. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. Cancer Incidence and Mortality World wide: IARC Cancer Base No. 11. Lyon, International Agency for Research on Cancer; 2013. [Fecha de acceso 20 de agosto de 2015] URL disponible en: <http://globocan.iarc.fr>
15. Fink N, Fernández A y Mazziotta D. Evaluación externa de la calidad analítica en hematología: una necesidad en América Latina. Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health 2(3), 1997.
16. García C y Martínez I. Ventajas del método de quimioluminiscencia frente al de radioinmunoanálisis (RIA). Visión Científica No.2 Vol 1 Año 2007.

17. González L, Ávila A, Echeverri C, Jaramillo S, Salazar R, Aristizábal B. Cáncer de mama: HER-2/neu, métodos diagnósticos y consideraciones clínicas. Rev Colomb CanCeRol 2007; 11 (1): 40-57.
18. Grupo ACMS Consultores, Acreditación ISO 15189 [fecha de acceso 19 de octubre de 2015] URL disponible en: <http://www.grupoacms.com/pdf/consultora-iso-15189.pdf>
19. Hammond M, Hayes D, Dowsett M, Allred D, Hagerty K, Badve S, Fitzgibbons P, Francis G, Goldstein N, Hayes M, Hicks D, Lester S, Love R, Mangu PB, McShane L, Miller K, Osborne C, Paik S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz J, Sweep F, Taube S, Torlakovic E, Valenstein P, Viale G, Visscher D, Wheeler T, Williams R, Wittliff J, Wolff A. Guide line recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. J Clin Oncol. 2010; 28 (16): 2784-2795.
20. INEGI (2015). Estadísticas a propósito del... día mundial de la lucha contra el cáncer de mama. 2015. [fecha de acceso 26 octubre de 2015] URL disponible en: <http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/mama0.pdf>
21. ISO 9004:2009. Gestión para el éxito sostenido de una organización-Enfoque de gestión de la calidad. Tercera edición. 2009.
22. ISO 15189:2012 (E). Medical laboratories-Requirements for quality and competence. Third edition. 2012.
23. Jhang J, Chang C, Fink D, Kroll M. Evaluation of Linearity in the Clinical Laboratory. Arch Pathol Lab Med Vol 128, January 2004.
24. Ludovini V, Gori S, Colozza M, Pistola L, Rulli E, Floriani I, Pacifico E, Tofanetti F, Sidoni A, et al. Evaluation of serum HER-2 extracellular domain in early breast cancer patients: correlation with clinicopathological parameters and survival. Annals of Oncology 2008; 19: 883–890.

25. Mamani A, Veloz M, Casasola I, Moctezuma C, García J. Frecuencia de sobreexpresión del factor Her-2/*neu* en pacientes con cáncer de mama. Ginecol Obstet Mex 2014; 82: 369-376.
26. Manual del usuario, Sistema de inmunoensayo ADVIA Centaur, 078D0014-03 Rev. B, 2008: 42-48.
27. Miller N y Miller C. Estadística y Quimiometría para Química Analítica, Editorial Prentice Hall, 4ª Edición, 2002.
28. Oficina de Acreditación Guatemala. Política de selección y validación de métodos de ensayo. 2007. [fecha de acceso 26 octubre de 2015] URL disponible en: <http://oga.org.gt/images/files/File/OGA-GEC-016.pdf>
29. Organismo Argentino de Acreditación (OAA). Guía para validación de métodos de ensayo; 2013. [fecha de acceso 28 octubre de 2015] URL disponible en: <http://www.oaa.org.ar/docs/GUI-LE-03%20v1.pdf>
30. Plebani M, Lippi G. HER-2: Closing the Gap Between Laboratory Testing and Clinical Practice. American Society for Clinical Pathology. 2009; 131: 897-903.
31. Rego A, Pérez H, López L y Carlos N. Sistema automatizado para la evaluación de la calidad en los laboratorios de diagnóstico con tecnología SUMA. Vaccimonitor vol.21 no.1 2012.
32. Roche Pharma. Hablemos de El Cáncer de mama con Roche. 3ra edición. 2011. pp 33.
33. Rodríguez G y Blanco R. Aseguramiento de la calidad analítica y norma ISO 17025 en laboratorios clínicos y químicos. Rev. costarric. cienc. Méd 2001.
34. Rosso R, Suigo E y Vignati G. Workflow and Efficiency Advantages of the New ADVIA Centaur XPT Immunoassay System. 2016. [Fecha de acceso 16 noviembre de 2016]
URL disponible en:
http://www.labmedica.com/whitepapers/centaurxpt_casestudy_160209-03350486.pdf

35. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC). 2012. Valores de referencia. [Fecha de acceso 14 noviembre de 2015]
URL disponible en: <http://www.seqc.es/>
36. Torres N, Rosquete R, Torres B, Carbajales I. Aseguramiento de la calidad en la etapa analítica en química clínica. AMC. 2007. vol.11 no.6.
37. US Department of Health and Human Services. Medicare, Medicaid and CLIA programs: Regulation implementing the Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988. Final rule. Fed Regist. 1992; 57: 7002-7186.
38. Verdú A, Colomer V, Román L, Erill S, Calvo L, Moreno C, Cerdán C, Puig T. Protocolo de estudio molecular del oncogén HER-2/neu en el carcinoma de mama. Clin Transl Oncol. 2005; 7 (11): 504-11.
39. Westgard James., Prácticas básicas de control de la calidad. 3ra Edición. 2010. pp 16.
40. Westgard O. James. Basic Method Validation. 3rd edition. 2008 pp. 29-30, 87-99, 111-122.
41. Won D, Han C. Impact of Serum HER-2 Levels on Survival and Its Correlation with Clinicopathological Parameters in Women with Breast Cancer. J. Breast Cancer 2012 March; 15(1): 71-78.

11. ANEXOS

11.1 ANEXO A

DEFINICIONES Y TÉRMINOS

A.1 Adecuado para el propósito: Grado en el que los datos resultantes de un proceso de medición le permiten al usuario tomar decisiones técnica y administrativamente correctas para el propósito establecido (NMX-CH-152-IMNC-2005).

A.2 Ámbito lineal: Es la parte de la función de calibración en la que la señal obtenida para el analito responde “linealmente” a la concentración. Se verifica mediante la obtención de un coeficiente de correlación mayor o igual a 0.995 (Metrología en el laboratorio clínico).

A.3 Analito: Especie de interés a determinar en un análisis (NMX-CH-152-IMNC-2005).

A.4 Calibración: Conjunto de operaciones que establecen, en condiciones especificadas, la relación entre los valores de las magnitudes indicadas por un instrumento de medición o un sistema de medición, o los valores representados por una medida materializada o un material de referencia, y los valores correspondientes de la magnitud realizada por los patrones (NMX-Z-055-1997-IMNC).

A.5 Corrida: Conjunto de muestras analizadas en forma continua, bajo las mismas condiciones experimentales (NOM-177-SSA1-1998).

A.6 Desviación/Sesgo: Error sistemático de un proceso de medición (NMX-CH-152-IMNC-2005).

Fórmula: Valor real (o teórico) – Valor obtenido (medias)

A.7 Ensayo/Prueba: Determinación de una o más características de acuerdo con un procedimiento (NMX-CH-152-IMNC-2005).

A.8 Exactitud de medición: Grado de la concordancia entre el resultado de una medición y un valor verdadero (o real) de lo medido (el mensurando) (NMX-CH-152-IMNC-2005).

A.9 Exactitud relativa: Grado de concordancia entre los resultados del método evaluado y los obtenidos utilizando un método de referencia reconocido (Política de selección y validación de métodos de ensayo).

A.10 Incertidumbre de medición: Parámetro asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente, ser atribuidos al mensurando (NMX-CH-152-IMNC-2005).

Incertidumbre Estándar 'u(xi): La incertidumbre del resultado de una medición expresada como una desviación estándar (CENAM, 2005).

Incertidumbre Estándar Combinada 'uc(y): la incertidumbre estándar del resultado de una medición cuando el resultado se obtiene a partir de los valores de un cierto número de otras magnitudes y es igual a la raíz cuadrada positiva de una suma de términos, siendo éstos, las varianzas o covarianzas de esas otras magnitudes ponderadas de acuerdo a como varía el resultado de la medición con respecto esas magnitudes (CENAM, 2005).

Incertidumbre Expandida 'U: magnitud que define un intervalo alrededor del resultado de una medición el que se espera cubra una fracción grande de la distribución de los valores que podrían atribuirse razonablemente al mensurando.

Nota 1: La fracción puede considerarse como la probabilidad de cobertura o nivel de confianza del intervalo.

Nota 2: Par asociar un nivel específico de confianza con el intervalo definido por la incertidumbre expandida, se requiere hacer suposiciones explícitas o implícitas con respecto a la distribución de probabilidad caracterizada por el resultado de medición y su incertidumbre estándar combinada. El nivel de confianza que puede atribuirse a este intervalo puede conocerse sólo hasta donde tales suposiciones pueden justificarse.

Nota 3: Una incertidumbre expandida U se calcula a partir de una incertidumbre estándar combinada Uc y un factor de cobertura k usando (CENAM, 2005):

$$U = k \cdot u_c$$

Factor de Cobertura 'k: factor numérico usado como multiplicador de la incertidumbre estándar combinada para obtener una incertidumbre expandida.

Nota: El factor de cobertura se encuentra típicamente en el intervalo de 2 a 3 (CENAM, 2005).

A.11 Intervalo de trabajo: Intervalo de las concentraciones analíticas o los valores de las propiedades sobre las cuales el método va a ser aplicado. Dentro del intervalo de trabajo puede existir un intervalo de respuesta lineal, en el que, la señal de respuesta sistema de medición tendrá una relación lineal con la concentración del analito o el valor de la propiedad (NMX-CH-152-IMNC-2005).

A.12 Límite de cuantificación: Es aquel valor de concentración mínimo que puede obtenerse con una imprecisión aceptable (NMX-CH-152-IMNC-2005).

A.13 Límite de detección: Concentración mínima de un analito en la matriz de una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo condiciones analíticas específicas (NMX-CH-152-IMNC-2005).

A.14 Linealidad: La capacidad (dentro de un intervalo dado) para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en las muestras de examen (NCCLS EP6-A,2002).

El término linealidad aplicado a un método analítico, se refiere al tramo de concentraciones del analito en el que la respuesta del sistema de medición es una función lineal de la concentración; la representación gráfica de este tramo (concentraciones frente a respuestas) debe exhibir una buena correlación de los puntos experimentales a la recta de regresión para que el método analítico en cuestión sea aceptable (NMX-CH-152-IMNC-2005).

A.15 Magnitud (medible): Atributo de un fenómeno, de un cuerpo o de una sustancia, que es susceptible de distinguirse cualitativamente y de determinarse cuantitativamente (NMX-CH-152-IMNC-2005).

A.16 Material de referencia (MR): Material o sustancia cuyo(s) valor(es) es(son) suficientemente homogéneo(s) y bien definido(s) para permitir su uso para la calibración de un instrumento, la evaluación de un método o la atribución de valores a los materiales (NMX-CH-152-IMNC-2005).

A.17 Material de referencia certificado (MRC): Material de referencia acompañado de un certificado cuyo(s) valor(es) de la(s) propiedad(es) es(son) certificado(s) por un procedimiento que establece su trazabilidad a una realización exacta de la unidad en la cual los valores de propiedad son expresados y para la cual cada valor certificado

está acompañado de una incertidumbre a un nivel de confiabilidad indicado (NMX-CH-152-IMNC-2005).

A.18 Medición: Conjunto de operaciones que tienen por finalidad determinar el valor de una magnitud (NMX-Z-055-IMNC-2005).

A.19 Mensurando: Magnitud particular sometida a medición (NMX-CH-152-IMNC-2005).

A.20 Método de medición: Secuencia lógica de las operaciones, descritas de manera genérica, utilizada en la ejecución de las mediciones (NMX-CH-152-IMNC-2005).

A.21 Método de referencia: Método ampliamente investigado, que describe clara y exactamente las condiciones y procedimientos necesarios, para la medición de uno o más valores de la propiedad, que han demostrado tener exactitud y precisión de acuerdo con su propósito de uso y que puede, por lo tanto, ser usado para evaluar la exactitud de otros métodos por la misma medición, permitiendo en particular la caracterización de un Material de Referencia (NMX-CH-152-IMNC-2005).

A.22 Método desarrollado por el laboratorio: Método analítico que no se encuentra en normas u otras colecciones de métodos, ni en publicaciones de terceros, habiendo sido desarrollado por el propio laboratorio (Política de selección y validación de métodos de ensayo, Oficina de Acreditación Guatemala, 2005).

A.23 Muestra de control: Material de composición conocida usado con el propósito de dar seguimiento al proceso analítico, que debe ser similar a las muestras que están siendo analizadas como muestras problema, en cuanto a la matriz, y al estado físico de preparación y el intervalo de concentración del analito (Política de selección y validación de métodos de ensayo, Oficina de Acreditación Guatemala, 2005).

A.24 Parámetros de desempeño del método: Son las propiedades, características o capacidades cuantificables del método que indican su grado de calidad; incluyen: exactitud, efecto de matriz, repetibilidad, reproducibilidad, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, intervalo analítico, sensibilidad, robustez. Todas estas características relacionadas con los resultados obtenibles por el método (Política de selección y validación de métodos de ensayo, Oficina de Acreditación Guatemala, 2005).

A.25 Porcentaje de error (% error): Se calcula dividiendo el sesgo (desviación) entre el valor teórico y el resultado es multiplicado por 100.

A.26 Porcentaje de recuperación (% recuperación): Se calcula dividiendo el valor obtenido entre el valor de referencia y el resultado es multiplicado por 100.

A.27 Porcentaje de error relativo (% de error relativo): Se calcula la diferencia del valor real menos el valor de la medición, entre el valor real; el resultado es multiplicado por 100.

A.28 Precisión: Grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos, utilizando una muestra homogénea, bajo condiciones establecidas (Política de selección y validación de métodos de ensayo, Oficina de Acreditación Guatemala, 2005).

A.29 Procedimiento de medición: Conjunto de operaciones, descritas de forma suficientemente detallada, que se utilizan para la ejecución de mediciones particulares de acuerdo a un método dado (NMXCH-152-IMNC-2005).

A.30 Sensibilidad Analítica (o metrológica): Es la relación entre la señal obtenida de un sistema de medición y la correspondiente concentración de analito, es decir, la pendiente de la función de calibración y no es sinónimo de límite de detección. Cuando la función de calibración es una recta, la sensibilidad analítica es constante en todo el intervalo de medida. Por el contrario, con funciones de calibración diferentes de la recta, la sensibilidad varía en función de la concentración del analito. El valor absoluto de sensibilidad analítica tiene utilidad para comparar entre sí diferentes procedimientos de medida o métodos basados en la medición de una misma señal física. Cuando se trata de funciones de calibración que no corresponden a una recta, la sensibilidad debe especificarse para una concentración determinada de analito o en forma de función de la concentración de analito (NMX-CH-152-IMNC-2005).

A.31 Validación: Confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos del método para una utilización o aplicación específica prevista (NMX-CH-152-IMNC-2005).

A.32 Valor Observado: Valor de un mensurando obtenido como resultado de una observación simple (NMX-CH-5725-1-IMNC-2006).

A.33 Veracidad: Grado de concordancia existente entre la media aritmética de un gran número de resultados y el valor verdadero o aceptado como referencia (NMX-CH-5725-1-IMNC2006). Se relaciona con la presencia de errores de tipo sistemático, también llamado “sesgo” o “desviación”; que puede expresarse como un valor absoluto o relativo al valor verdadero (NMX-CH-152-IMNC-2005).

A.34 Verificación: Confirmación mediante la aportación de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos especificados para un método (NMX-CC-9000-IMNC-2000). La verificación consiste en evaluar el desempeño del método para demostrar que cumple con los requisitos para el uso previsto, que fueron especificados como resultado de su validación (NMX-CH-152-IMNC-2005).

11.2 ANEXO B

Documentos y protocolos internacionales escritos por la CLSI, en los cuales brindan los lineamientos necesarios para llevar a cabo la validación y/o verificación de un equipo.

- NCCLS document EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved-Second Edition (2004).
 - NCCLS document EP6-A: Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline (2003).
 - NCCLS document EP7-A: Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline (2002).
 - NCCLS document EP9-A2: Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline - Second Edition (2002).
 - NCCLS document EP10-A2: Preliminary Evaluation of Quantitative. Clinical Laboratory Methods; Approved Guideline - Second Edition (2002).
 - NCCLS document EP12-A: User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline (2002).
 - NCCLS document EP14-A: Evaluation of Matrix Effects; Approved Guideline (2001).
 - NCCLS document EP15-A: User Demonstration of Performance for Precision and Accuracy; Approved Guideline (2001).
 - NCCLS document EP17-A: Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline (2012).
 - NCCLS document EP21-A: Estimation of Total Analytical Error for Clinical Laboratory Methods; Approved Guideline (2003).
- Nota aclaratoria: El National Committee for Clinical Laboratory Standards hasta el 2004 fue conocido como NCCLS, actualmente es Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).
- NMX-CH-152-IMNC-2005. Metrología en Química-Vocabulario.

- NMX-Z-055-1997-IMNC, Metrología vocabulario de términos fundamentales y generales.
- NMX-CH-5725-1-IMNC-2006. Exactitud (veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición, Parte 1: Principios generales y definiciones. 1ra. Edición, 2006.
- NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.

11.3 ANEXO C

Encuesta para participar en el traslado de límites de referencia para la implementación de la prueba HER2/neu en el equipo ADVIA CENTAUR en el INCAn.

Responde las siguientes preguntas con completa sinceridad:

1. ¿Cuál es su edad: 24 - 75
2. ¿Se considera una persona saludable?: SI NO
3. ¿Hace ejercicio regularmente?: SI NO
4. ¿Se ha enfermado recientemente?: SI NO
5. ¿Toma algún medicamento de prescripción médica?: SI NO
6. ¿Es usted diabética?: SI NO
9. ¿Fuma?: SI NO
10. ¿Lleva alguna dieta en particular?: SI NO
11. ¿Toma bebidas alcohólicas?: SI NO
12. ¿Padece o padeció cáncer de mama?: SI NO
13. ¿Tiene familiares directos que padecieron o padecen esta enfermedad?: SI NO
14. ¿Continúa menstruando?: SI NO
15. ¿Toma algún tratamiento hormonal?: SI NO
16. ¿Está embarazada?: SI NO
17. ¿Está lactando?: SI NO
18. ¿Tiene hijos?: SI NO
19. ¿Toma tratamiento oral o implantes anticonceptivos?: SI NO

NOTA: Para que pudiesen forma parte del estudio tenían que responder de esta forma la encuesta, cumpliendo así con los criterios de inclusión y exclusión.