



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
ESPECIALIZACIÓN EN BIOQUÍMICA CLÍNICA
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

VERIFICACIÓN DEL DESEMPEÑO ANALÍTICO DE ANTICUERPOS ANTI BETA
2 GLICOPROTEÍNA 1 Y ANTI CARDIOLIPINA

TESINA
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN BIOQUÍMICA CLÍNICA

PRESENTA:
QFB CÉSAR VALLEJO GONZÁLEZ

ASESOR:
EBC LINA TERESA ROMERO GUZMÁN

CIUDAD UNIVERSITARIA, Cd. Mx., 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Jurado asignado:

Presidente	Dra. Ma. de los Ángeles Granados Silvestre
Vocal	M. en C. María Guadalupe Ortiz López
Secretario	EBC. Virginia Martínez Bezies
1er Suplente	EBC. Ana Margarita Zavala Ortiz
2º Suplente	M. en C. Julio César Martínez Álvarez

Trabajo realizado en el laboratorio de Inmunología del Instituto Nacional de Pediatría.

Asesor del Tema:

EBC. Lina Teresa Romero Guzmán

Sustentante:

Q.F.B César Vallejo González

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, mi familia y mi hermana que me han dado todo su apoyo en mi vida profesional.

Al todos los integrantes del laboratorio de Inmunología del Instituto Nacional de Pediatría, especialmente Gaby y a Tere por su orientación, apoyo, y ánimos para seguir adelante.

A mi tutora y asesora por su apoyo y por las facilidades para la realización de este trabajo.

A Anayeli por su gran apoyo incondicional y compañía a mi lado durante gran parte de este camino.

Índice de contenido

1	Introducción.....	1
2	Antecedentes.....	3
3	Justificación.....	4
4	Hipótesis.....	5
5.	Marco teórico	
5.1	Concepto de calidad.....	6
5.2	Certificación.....	6
5.3	Norma ISO 15189 y requisitos de gestión.....	7
5.4	Acreditación.....	8
5.5	Verificación de pruebas cuantitativas.....	9
5.5.1	Guía de la Entidad Mexicana de Acreditación.....	9
5.5.2	Documento EP15-A2 “Guía del usuario para verificación de precisión y veracidad”.....	11
5.6	Control de calidad estadístico.....	13
5.6.1	Guía C24 A2.....	13
5.7	Métrica Six Sigma.....	18
5.8	Síndrome anti fosfolípidos.....	19
5.8.1	Patogénesis.....	19
5.8.2	Epidemiología.....	21
5.8.3	Manifestaciones clínicas.....	21
5.8.4	Diagnóstico.....	22
6	Objetivo general.....	24
6.1	Objetivos específicos.....	24
7	Materiales y métodos.....	24
8	Resultados.....	27
9	Discusión de resultados.....	39
10	Conclusiones.....	42
11	Referencias.....	43
12	Anexos	
	Anexo 1 Procedimiento para evaluar linealidad.....	48
	Anexo 2 Procedimiento para verificar precisión.....	49
	Anexo 3 Procedimiento para evaluar veracidad mediante materiales de referencia.....	51

Índice de Tablas

Tabla 1. Principales hechos históricos en la descripción del síndrome antifosfolípidos.....	20
Tabla 2. Resultados del proceso de verificación de precisión.....	32
Tabla 3. Resultados de veracidad para anticuerpos anti β 2GP1 IgA, IgG e IgM.....	33
Tabla 4. Resultados de veracidad para anticuerpos aCL IgA, IgG e IgM.....	33
Tabla 5. Resultados del análisis de linealidad para anticuerpos aCl y anti β 2GP1.....	34
Tabla 6. Resumen de parámetros de desempeño.....	35
Tabla 7. Esquema de control de calidad interno.....	36

Índice de figuras

Figura 1. Procesos del laboratorio involucrados en el sistema de gestión de calidad.....	7
Figura 2. Distribución gaussiana normal de un material de control.....	13
Figura 3. Aplicación de reglas de Westgard.....	15
Figura 4. Mecanismo de formación de trombo mediado por anticuerpos afl.....	21
Figura 5. Evaluación de precisión para anticuerpos aCl.....	28
Figura 6. Evaluación de precisión para anticuerpos anti β 2GP1.....	29
Figura 7. Evaluación de veracidad para anticuerpos aCl y anti β 2GP1.....	30
Figura 8. Evaluación de linealidad para anticuerpos aCl y anti β 2GP1.....	31
Figura 9. Gráfico OPSpecs.....	35
Figura 10. Coeficientes de variación mensual para anticuerpos aCl y anti β 2GP1.....	36
Figura 11. Gráficas de control para anticuerpos aCl.....	37
Figura 12. Gráficas de control para anticuerpos anti β 2GP1.....	38

Abreviaturas

aCl	Anticardiolipina
AL	Anticoagulante lúpico
afl	Anticuerpos antifosfolípidos
β2GP1	β2 glicoproteína 1
CLSI	Clinical Laboratory Standard Institute
CV	Coefficiente de variación
DE	Desviación estándar
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas
EMA	Entidad Mexicana de Acreditación
ETa	Error Total máximo permitido
fl	Fosfolípido
Ig	Inmunoglobulina
ISO	Organización Internacional para la Estandarización
LES	Lupus Eritematoso Sistémico
Pde	Probabilidad de detección de errores
Pfr	Probabilidad de falso rechazo
SAFL	Síndrome antifosfolípidos
Sr	Precisión intra corrida declarada por el fabricante
Sl	Precisión intra laboratorio declarada por el fabricante
SGC	Sistema de Gestión de Calidad

Resumen

El síndrome antifosfolípidos es una enfermedad autoinmune caracterizada por la presencia de trombosis y morbilidad durante el embarazo. El diagnóstico por laboratorio se basa en demostrar la presencia de anticoagulante lúpico (AL), anticuerpos anticardiolipina (aCl) y anticuerpos anti β 2 glicoproteína 1 (β 2GP1).

El presente trabajo tiene como objetivo verificar el desempeño analítico de anticuerpos aCl y anti β 2GP1 de tipo IgA, IgM, e IgG determinados mediante Inmunoensayo Adsorbente Ligado a Enzimas de tipo colorimétrico y de acuerdo a las guías EP15-A2 del CLSI y de la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA).

La precisión inter corrida obtenida durante los cinco días de análisis fue menor al 10% en cada una de las tres inmunoglobulinas tanto en el nivel bajo como en el alto, (excepto nivel bajo de anticuerpos aCl IgA con 11.9%); en ningún caso se encontró diferencias significativas entre la precisión del inserto y la obtenida experimentalmente. Mientras que el ensayo de veracidad muestra que los porcentajes de recuperación de las pruebas fueron de 94-99% para anticuerpos anti β 2GP1 y de 95-122% para anticuerpos aCl (nivel alto de IgA con 72%). Se observó un coeficiente de correlación r de al menos 0.99 en todas las pruebas (aCl IgA con 0.984). Se encontró un %CV total menor al 20% durante el 2017 en ambos analitos. Las reglas establecidas con ayuda de los gráficos OPSpecs fueron: $1_{2.5s}$ para anticuerpos aCl IgG y $1_{3.5s}$ para anticuerpos anti β 2GP1 IgA, IgG e IgM. Los resultados de verificación para la marca EUROIMMUN y los correspondientes al control de calidad son aceptables para la acreditación de estas pruebas bajo la norma ISO 15189.

Palabras clave: Síndrome antifosfolípidos, veracidad, precisión, coeficiente de variación, verificación.

1. Introducción

Existe un amplio número de desordenes relacionados con la presencia de anticuerpos antifosfolípidos (afl), los cuales han sido punto de interés y abordaje de diversas disciplinas como lo son la Inmunología, Hematología, Obstetricia, Reumatología, entre otras.

El síndrome antifosfolípidos (SAFL) es una enfermedad multisistémica autoinmune caracterizada por trombosis venosas y/o arteriales, morbilidad en el embarazo y presencia de afl, incluyendo: AL, anticuerpos anti β 2GP1 y anticuerpos aCl^{1,6}. Los afl representan un grupo heterogéneo de anticuerpos dirigidos contra un gran número de fosfolípidos y complejos fosfolípido-proteína. La principal proteína reconocida de carácter antigénico es la β 2 glicoproteína 1, la cual junto con la protrombina representan más del 90% de la actividad de unión con anticuerpos en pacientes con SAFL². La determinación de anticuerpos aCl y anti β 2GP1 mediante ELISA (Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas) representa un gran reto en el laboratorio clínico debido a la gran variabilidad en los resultados³⁻⁵.

Por otra parte, los laboratorios clínicos son esenciales para el diagnóstico de diversas patologías, sus actividades van desde la preparación del paciente hasta la validación y reporte de resultados. Deben contar con estrategias de control de calidad interno que permitan vigilar la variabilidad del sistema analítico para cualquier prueba que se realice. Sin embargo, las guías actuales no realizan recomendaciones o estrategias de cómo monitorear la variabilidad de anticuerpos aCl y anti β 2GP1^{5,7} así como tampoco existe ningún valor máximo permitido sobre veracidad y error total que pueda ser implementado en el análisis estadístico de los resultados.

Una forma en que el laboratorio puede demostrar calidad y confiabilidad en sus servicios es mediante la acreditación bajo la norma ISO 15189 “Laboratorios clínicos requisitos de la calidad y competencia”, un estándar internacional que contiene los requerimientos necesarios de competencia técnica y gestión de calidad⁸. Mediante esta norma y su equivalente mexicana (NMX-EC-15189-EC-IMNC-2015) el laboratorio busca la acreditación, una herramienta que

permite asegurar que se emiten resultados clínicamente relevantes. En México la acreditación de los laboratorios clínicos y bancos de sangre se realiza a través la EMA.

Uno de los requisitos establecidos en la NMX-EC-15189-EC-IMNC-2015 es el punto 5.5.1.2, donde establece que: “el laboratorio debe realizar la verificación de métodos desarrollados por el fabricante para confirmar las características del desempeño antes de ser usadas de manera rutinaria”. Los protocolos disponibles de cómo realizar la verificación de métodos cuantitativos se describen en las guías de la EMA y en diversos documentos del CLSI.

Mediante el proceso de verificación se obtienen datos acerca del desempeño en condiciones particulares del laboratorio y luego se comparan con las especificaciones del fabricante y los requerimientos de calidad para asegurar que los resultados son confiables y clínicamente útiles⁹.

2. Antecedentes

El SAFL se define como una trombofilia autoinmune adquirida, su diagnóstico requiere fundamentalmente la evidencia de trombosis o morbilidad obstétrica así como la presencia de afl realizada al inicio y confirmada posteriormente¹⁰.

Las primeras determinaciones se realizaban mediante radioinmunoanálisis¹¹ y fueron sustituidas por técnicas de ELISA en fase sólida, facilitando la investigación y estudios clínicos¹². Desde que ésta metodología fue introducida con fines diagnósticos se han descrito variaciones significativas inter corrida e inter laboratorios^{13, 14}.

Las características de desempeño analítico mínimas para cualquier proceso que permiten tener un adecuado control de calidad planificado son: **imprecisión y sesgo**, brindando información acerca del desempeño en condiciones estables y con ello identificar cuándo es que un proceso se encuentra dentro de su variabilidad natural y cuándo no¹⁵.

La verificación de métodos es parte del proceso de acreditación del laboratorio clínico mediante la norma ISO 15189. Este procedimiento se realiza con el objetivo demostrar que el sistema se desempeña de acuerdo a las especificaciones declaradas por el fabricante. De acuerdo con la EMA, en México existen hasta la fecha 91 laboratorios acreditados en la disciplina de Inmunología¹⁶. Sin embargo, muy pocos en la determinación de afl, además no existe ningún proveedor de ensayos de aptitud en el país que ofrezca el control externo de estos analitos ni controles de tercera opinión, motivo por el cuál no existe información acerca del desempeño local para estas pruebas.

Únicamente programas internacionales como el ofrecido por el RCPA QAP (Royal College of Pathologists of Australasia Quality Assurance Program) ofrecen un control externo de afl y una manera de conocer el desempeño real para el resto de laboratorios que no participan en estos programas es mediante el proceso de verificación.

3. Justificación

La verificación de métodos y la planificación del control de calidad interno son procesos importantes en el laboratorio clínico que permiten conocer el desempeño real de las pruebas, tener criterios de aceptación o rechazo de resultados, mejorar la detección de errores, disminuir el número de reprocesos y son parte de los requisitos para el proceso de acreditación. Un adecuado control de calidad estadístico brinda la seguridad de que los resultados son adecuados para el cuidado del paciente.

Las guías nacionales e internacionales recomiendan que el usuario debe realizar una evaluación para verificar que los resultados son conformes con el desempeño declarado por el fabricante antes de utilizar un nuevo método o equipo de diagnóstico. Por otra parte, los métodos analíticos actuales por ELISA presentan gran variabilidad inter e intra corrida en la determinación de anticuerpos aCl y anti β 2GP1.

Las determinaciones de anticuerpos aCl y anti β 2GP1 en el laboratorio de Inmunología del Instituto Nacional de Pediatría se realizan de manera cuantitativa y la interpretación se basa en un punto de corte, lo que representa un reto al realizar procedimientos de verificación y control de calidad para este tipo de pruebas debido a la diferencia con métodos cuantitativos tradicionales. Este trabajo pretende realizar el proceso de verificación y establecer criterios de aceptación adecuados para el control de calidad interno.

4. Hipótesis

La verificación de anticuerpos aCl y anti β 2GP1 en el equipo Analyzer I-2P de la casa comercial EUROIMMUN permitirá tener conocimiento del desempeño real y ayudará a establecer límites aceptables en el control de calidad interno dentro del laboratorio de Inmunología, permitiendo obtener resultados confiables para el diagnóstico del síndrome antifosfolípidos.

5. Marco teórico

5.1 Concepto de calidad

El objetivo fundamental del laboratorio clínico es proporcionar resultados confiables y clínicamente relevantes para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Los resultados impactan directamente en el cuidado de la salud, resultados inexactos pueden traducirse en retrasos en el diagnóstico, tratamientos incorrectos y repetición innecesarias de pruebas, lo que incrementa tiempo y costos¹⁹.

La calidad se puede definir como el grado en el que un conjunto de características inherentes de un objeto cumple con los requisitos¹⁷. Mientras que un concepto diferente de acuerdo a Joseph Moses Juran es: aptitud para el uso o adecuación al uso, es decir, las características del producto que resultan adecuadas para el usuario final; conformidad al uso no a las especificaciones¹⁸.

Algunas de las normas más importantes para llegar a un correcto funcionamiento y tener plena confianza en la calidad de los resultados de un laboratorio clínico son:

- ❖ **Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011**; de carácter obligatorio.
- ❖ **Norma ISO 9001/NMX-CC-9001-IMNC-2015**, para la certificación del sistema de gestión de calidad; de carácter voluntario.
- ❖ **Norma ISO 15189:2012/ NMX-EC-15189-IMNC-2015**, para la acreditación y requisitos de competencia técnica; de carácter voluntario.

5.3.1 Certificación

Actualmente se realiza bajo la norma ISO 9001:2015/NMX-CC-9001-IMNC-2015, la cuál es una norma “genérica” que es aplicable a cualquier tipo de organización, ya que evalúa únicamente el sistema de gestión de calidad²⁰ (SGC). La certificación se define como:

“Procedimiento mediante el cuál una tercera parte da garantía que un producto, proceso o servicio es conforme con requisitos especificados.”

5.3.2 Norma 15189 y requisitos de gestión

La norma ISO 15189:2012 y su equivalente mexicana NMX-EC-15189-IMNC-2015 “Requisitos de la calidad y la competencia” tienen el propósito de dar mejores estrategias de manejo de la calidad, acreditación del SGC, competencia técnica y confiabilidad en los resultados emitidos⁸ (**Figura 1**). Esta norma abarca aspectos como:

- ❖ Fase pre examen, fase de examen y fase post examen.
- ❖ Variabilidad biológica, relevancia médica.
- ❖ Verificación de métodos e incertidumbre.
- ❖ Control de calidad.
- ❖ Certificación y sistema de gestión.



Figura 1. Procesos del laboratorio involucrados en el sistema de gestión de calidad.

Fuente: Organización Mundial de la Salud. (2016). Sistema de Gestión de calidad en el laboratorio.

Un sistema es una serie de funciones o actividades que trabajan juntas para cumplir su objetivo²¹. El modelo fundamental de un sistema de gestión de calidad es el ciclo PHRA²² que se resume de la siguiente forma:

- ❖ **Planificar:** Mediante protocolos o planes empleando estadística.
- ❖ **Hacer:** Ejecución del plan.
- ❖ **Revisar:** Comprobar que se ha alcanzado el objetivo o la mejora.
- ❖ **Actuar:** Establecer estrategias de prevención.

5.3.3 Acreditación

El proceso quizá mas difícil es el conseguir la acreditación bajo la norma ISO 15189:2012 o su equivalente mexicana la NMX-EC-15189-IMNC-2008; la cual se define como:

“Procedimiento mediante el cuál un organismo autorizado da reconocimiento formal que una organización o individuo es competente para llevar a término tareas específicas”

Mediante la acreditación se reconoce la competencia técnica de la organización para realizar ensayos definidos, por esto, la acreditación del laboratorio es un proceso con mayor exigencia en requisitos técnicos que la certificación.

Ventajas de la acreditación

Algunas de las ventajas más importantes del proceso de acreditación²³ son:

- ❖ Demostrar de manera objetiva la competencia técnica y el cumplimiento del SGC.
- ❖ Mejorar las ventajas competitivas en el mercado y la calidad de exámenes clínicos.
- ❖ Aumentar la confianza de los clientes en procesos y resultados.
- ❖ Incrementar utilidades y reducir los costos de la no calidad.

Requisitos de acreditación

La evaluación por parte del organismo acreditador tiene que cubrir generalmente los siguientes puntos:

- ❖ Competencia técnica del personal del laboratorio.
- ❖ Apropiada verificación de los métodos de prueba.
- ❖ Revisión del historial clínico y resultados previos de pacientes.
- ❖ Trazabilidad de calibradores a estándares de referencia.
- ❖ Calibración y mantenimiento de equipos.
- ❖ Control y aseguramiento de la calidad.
- ❖ Procedimientos para el uso de laboratorios de referencia así como centros de alta especialidad.

5.4 Verificación de pruebas cuantitativas

De acuerdo con el numeral 5.3.1.2 de la NMX-EC-15189-IMNC-2015, “el laboratorio debe verificar una vez instalado y antes de su uso, que el equipo es capaz de alcanzar el desempeño necesario y si es que cumple con los requisitos pertinentes para su uso previsto”. Es decir, confirmar mediante evidencia objetiva que se han cumplido las especificaciones declaradas para el procedimiento.

Las características a verificar deben de ser aquellas que son relevantes para el uso previsto de los exámenes. La guía EP15-A2 publicada por el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) y la “Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de exámenes cuantitativos empleados por el laboratorio clínico” emitida por la EMA, son aceptadas para propósitos de acreditación. Dos de los conceptos más importantes a ser verificados son:

Precisión: Proximidad entre valores obtenidos en mediciones repetidas de un mismo objeto bajo condiciones específicas²⁴. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar típica (DE), coeficiente de variación (CV) o varianza (S^2).

Veracidad: Sesgo o BIAS, se define como la concordancia entre la media aritmética de un número de resultados y el valor aceptado como verdadero²⁴.

5.4.1 Guía de la Entidad Mexicana de Acreditación

Evaluación de la Precisión

Pueden aplicarse cualquiera de las dos opciones siguientes:

- 1.- Realizar 20 determinaciones en la misma corrida (precisión intra serie o intra corrida) o en el transcurso de 24 horas (intradía) de un material control o muestras de pacientes de valor conocido o no.
- 2.- Utilizar 20 valores obtenidos uno por día de una misma muestra de paciente o material de control interno del mismo lote (inter corrida).

Criterio de aceptación

La DE obtenida debe ser menor a la declarada por el fabricante, en caso de que ocurra lo contrario, el laboratorio tendrá que aportar evidencia objetiva de que no existe diferencia

estadísticamente significativa. De acuerdo a CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendments), la DE intra corrida debe ser menor o igual al 25% del Error Total máximo permitido (ETa) y la DE inter corrida menor o igual a 33% del Eta²⁵.

Evaluación de la Veracidad

- a) **Valoración por cálculo de error relativo y porcentaje de recuperación.** El porcentaje de recuperación y de error relativo se obtienen mediante las siguientes formulas:

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

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

El valor obtenido debe ser menor o igual al reportado en el inserto por el fabricante en ambos casos.

- b) **Evaluación de la veracidad mediante estudios de comparación de métodos.** Este protocolo es empleado para estimar el error sistemático, se analizan muestras de pacientes por dos métodos diferentes, uno es el método de prueba y el otro de referencia o de comparación²⁶.
- c) **Estudios de comparación inter laboratorios.** Los valores asignados por consenso en programas de ensayos de aptitud a muestras de control pueden ser utilizados para la determinación de la veracidad de la medición.

Evaluación de linealidad

Se evalúan muestras de valor conocido y de concentración alta, a partir de la cuales se realizan diluciones. La linealidad se obtiene al trazar la mejor línea recta que toque la mayor cantidad de puntos²⁷. El procedimiento consiste en preparar 5 diluciones (4 diluciones es aceptable) a partir de materiales de referencia certificados, calibradores o sueros de pacientes con concentraciones altas y bajas (Ver Anexo 1).

5.4.2 Documento EP15-A2 “Guía del usuario para verificación de precisión y veracidad”

Este documento se usa cuando en el laboratorio se establece un método analítico y se desea verificar su desempeño antes de ser usado con muestras de pacientes, aunque también puede ser usado para verificar el desempeño después de haber realizado acciones correctivas o cuando no fue aprobado algún examen de aptitud^{28, 29}.

Verificación de la precisión

El protocolo provee métodos estadísticos para verificar precisión intra corrida o repetitibilidad S_r (medida cuantitativa del grado de dispersión entre replicados cuando son analizados en idénticas condiciones o dentro de una misma corrida) y la precisión dentro del laboratorio S_l , (medida cuantitativa del grado de dispersión entre replicados cuando son analizados en un periodo largo de tiempo), refleja la precisión acumulada y de diferentes fuentes de error.

Precisión intra corrida S_r

Analizar en una corrida por día, tres replicados de cada uno de dos niveles de material de control durante 5 días. Se calcula mediante la siguiente formula:

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{d=1}^D \sum_{i=1}^n (X_{di} - \bar{X}_d)^2}{D(n-1)}}$$

Dónde:

D= Número total de días (cinco)

n= Número total de replicados (tres)

X_{di} = Resultado de replicados por día (3 replicados) y

\bar{X}_d = Promedio de todos los resultados por día d

Precisión intra laboratorio S_l

Calcular la varianza (S_b^2) para las medias diarias mediante la siguiente formula:

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

Dónde:

\bar{X}_d = Promedio de todos los resultados por día d (\bar{X}_1 es el promedio para el día 1) y

$\bar{\bar{X}}$ = Promedio de todos los resultados.

Calcular finalmente *SI* con la siguiente formula:

$$S_l = \sqrt{\frac{n-1}{n} * S_r^2 + S_b^2}$$

Dónde:

n = número de replicados por corrida (tres).

Si la precisión del fabricante esta declarada en términos de coeficiente de variación se convierte en desviación estándar:

$$SD_r = CV\%_r * \bar{X}$$

$$SD_l = CV\%_l * \bar{X}$$

Dónde:

$CV\%_r$ = repetibilidad (coeficiente de variación intra corrida) declarada por el fabricante.

$CV\%_l$ = coeficiente de variación intra laboratorio o coeficiente de variación total declarada por el fabricante.

Criterio de aceptación

Si *Sr* y *Sl* son menores que *SDr* y *SDl* respectivamente, se demuestra que la precisión es consistente con la declarada en el inserto, de lo contrario se debe verificar si existen diferencias estadísticamente significativas (Ver Anexo 2).

Veracidad

La evaluación de la veracidad se puede realizar mediante:

- a) **Comparación de resultados de muestras de pacientes con otro procedimiento de medida.** Mediante este procedimiento se evitan varios artefactos presentes en los materiales de referencia. El procedimiento asegura la habilidad del laboratorio de emitir resultados equivalentes no importando el método analítico utilizado.
- b) **Porcentaje de recuperación a partir de materiales de referencia.** Este método es mas conveniente para la verificación después de un procedimiento de calibración o cuando no es aprobado algún ensayo de aptitud. Pueden obtenerse de diversas fuentes:
 - 1) obtenidos de alguna organización internacional, 2) del proveedor para verificar

veracidad, precisión o control de calidad, 3) obtenidos de programas de comparación inter laboratorios (Ver Anexo 3).

5.5 Control de calidad estadístico

El inicio del control de calidad estadístico de calidad tiene sus inicios gracias a Walter A. Shewhart³⁰. El objetivo de una carta de control es obtener una respuesta a partir de valores conocidos de una muestra control. En la **Figura 2** se observa una distribución normal o Gaussiana, donde el 68% de datos se encuentran dentro de la media $\pm 1DE$; 95.5% $\pm 2DE$ y el 99.7% $\pm 3DE$, es decir, sólo un 32 %, 4.5% y 0.3% de valores estarán fuera de $\pm 1DE$, $2DE$ y $3DE$ respectivamente.

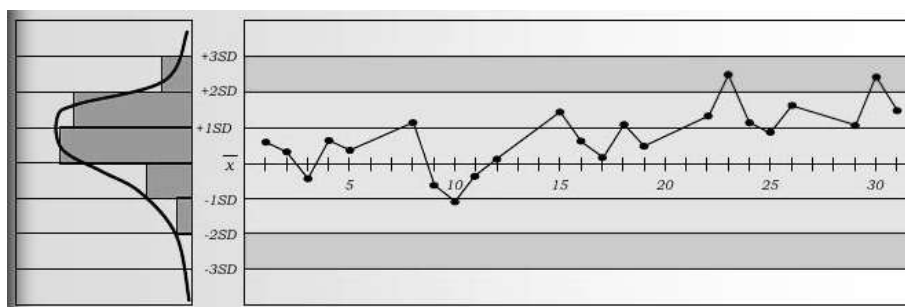


Figura 2. Distribución gaussiana normal de un material de control. A) Histograma B) Gráfico de control, permite visualizar más fácil y rápido el comportamiento de los datos alrededor de una media.

5.5.1 Guía del CLSI C24 A2

Se han desarrollado diversas metodologías para llevar a cabo un procedimiento de control estadístico satisfactorio, como el sistema multi reglas de Westgard, así como la guía del CLSI C24 A2. Esta última describe los principios y definiciones para el manejo del proceso estadístico de calidad teniendo en cuenta las necesidades médicas.

Planificación de un sistema estadístico de control de calidad

Para realizar un control de calidad estadístico completo de acuerdo al documento C24 A2, es necesario planificar el propio proceso de control³¹, lo cual implica los siguientes pasos:

- ❖ Definir los requisitos de calidad para cada prueba.
- ❖ Determinar las características de desempeño en condiciones estables.

- ❖ Identificar la mejor estrategia candidata de control.
- ❖ Especificar las metas deseables del desempeño para el plan de control.
- ❖ Seleccionar la estrategia de control de calidad cuyo rendimiento previsto cumpla o exceda los objetivos de rendimiento del control de calidad.

Requisito de calidad y metas analíticas

Un requisito de calidad puede ser definido en términos de ETa^{32} . El ETa es el Error máximo que puede ser aceptado para una prueba específica sin invalidar la calidad del resultado. Es un concepto que engloba tanto error sistemático como aleatorio, es decir sesgo e imprecisión³³.

Determinación del desempeño del método

Al estimar éstos parámetros podemos establecer el desempeño estable particular del laboratorio.

Estrategias de control

Una estrategia de control se basa en definir qué materiales control serán usados, qué tantas muestras control serán analizadas, en qué lugar de la corrida serán colocadas, cuándo y cuáles reglas serán aplicadas a los resultados de control.

Longitud de la corrida analítica

La corrida analítica es el intervalo (periodo de tiempo o una serie de mediciones) dentro del cual la exactitud y precisión del sistema de medida se espera que sean estables. La longitud de la corrida analítica determina el número de muestras de control y el tiempo de análisis entre cada una de ellas. No existen metodologías bien establecidas para determinar la longitud de una corrida analítica.

Frecuencia y localización de las muestras de control

Las muestras control deben de ser analizadas al menos una vez durante cada corrida analítica. Aún existe controversia y no hay métodos estandarizados para establecer la frecuencia de corrida de control. La norma ISO 15189 únicamente menciona lo que hay que hacer sin decir a

detalle cómo realizarlo. Por otro lado, de acuerdo a CLIA, el laboratorio debe tener procedimientos de control que monitoricen la precisión y veracidad del proceso analítico³⁴.

Localización del material de control

El analista debe determinar la localización de las muestras dentro de la corrida analítica, considerando el tipo de errores que pudieran ocurrir:

- ❖ **Número pequeño de muestras.** Los controles pueden colocarse al final o la mitad la corrida para detectar cambios en las muestras de pacientes.
- ❖ **Número grande de muestras.** Una longitud apropiada es en ciertos intervalos de tiempo donde las muestras de control se analizan al inicio de la corrida.

Control multi reglas

Algunos criterios de decisión pueden usarse, la mayoría asumiendo una distribución gaussiana normal (**Figura 3**). Las reglas de control deben detectar errores sistemáticos y aleatorios; generalmente se usa la regla 1_{3s} y R_{4s} para detectar errores aleatorios, mientras que los errores sistemáticos pueden detectarse con la regla 2_{2s} , o al observar de 4 a 12 datos del mismo lado de la media.

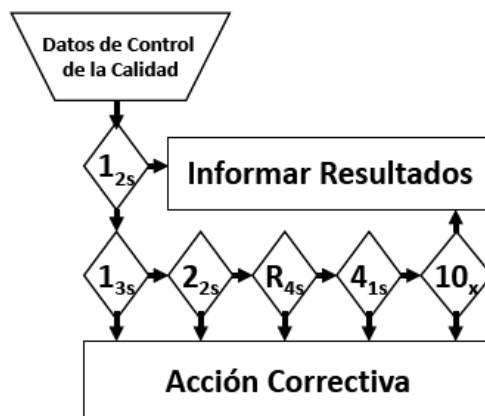


Figura 3. Aplicación de reglas de Westgard. Primero se revisa si los resultados se encuentran dentro de 2 desviaciones estándar y en tal caso informan los resultados, de lo contrario se procede revisando como se indica en la figura.

Fuente: Westgard, James O. (2013). Prácticas básicas de control de calidad. Capacitación en control estadístico de la calidad para laboratorios clínicos. Edición Wallace Coulter. Madison WL.

Detección de errores y probabilidad de falso rechazo

La ventaja del uso de un sistema multi reglas es que permite tener una baja probabilidad de falsos rechazos (Pfr) y mantener una alta la probabilidad de detección de errores (Pde). En resumen, se debe evitar el uso de la regla 1_{2s} y comenzar a usar reglas alternativas como $1_{3,5s}$, 1_{3s} y $1_{2.5s}$ pues poseen baja Pfr. Una sola regla puede ser suficiente para tener una adecuada detección de errores y baja probabilidad de falso rechazos.

El objetivo es tener un esquema que permita al menos el 90% de detección de errores y 5% o menos de falsos rechazos. Los sistemas analíticos actuales son muy estables que podrían tener buenos resultados con reglas con una Pde de 50%. Usando la regla 1_{2s} se puede obtener información acerca de cuándo es que el sistema se aproxima a una situación fuera de control, sin embargo, si se usa como regla de rechazo causa una alta tasa de falsos rechazos.

Condiciones fuera de control

Si los resultados de control se encuentran dentro de los límites establecidos, se pueden validar e informar los resultados, de lo contrario se deberá corregir la condición fuera de control y revisar que el problema está resuelto antes de informar resultados de pacientes. Existen malas prácticas sobre qué hacer cuando un resultado de control se encuentra fuera de los límites permitidos como se menciona a continuación³⁶:

Repetir el control: Repetir el control es evidenciar que no confiamos en los resultados de pacientes. Si se planificó el control de calidad correctamente teniendo en cuenta la calidad necesaria para cada prueba, entonces la probabilidad de falso rechazos debería ser baja mientras que la probabilidad de detección de errores debería ser alta. Repetir el control es una práctica que no tiene sentido. La cuestión es que al repetir un control, este puede “caer” dentro de los límites y parecer un resultado válido, pero lo que ocurrirá sin darse cuenta es que se pospone la presentación de un problema.

Analizar un nuevo control: Otra mala práctica es asumir que el control es el responsable de la condición fuera de control sin haber hecho un análisis antes y descartar otras opciones.

Aunque es cierto que aspectos como controles cerca de su fecha de caducidad, de poco volumen remanente o de mal manejo (almacenamiento, reconstitución) pueden atribuírseles el motivo de resultados fuera de límites y no tendrían que involucrarse otras partes del sistema analítico, sin embargo, si el laboratorio tiene estandarizado estos procedimientos, la probabilidad de que éstas sean las causas de resultados fuera de control es pequeña.

Causas de error sistemático.

Usualmente las causas de un error sistemático son más fáciles de resolver que los de tipo aleatorio, las principales causas de error sistemático son:

- ❖ Cambios de lote reactivo y/o calibrador.
- ❖ Degradación del calibrador.
- ❖ Condiciones inadecuadas de almacenamiento/preparación de reactivos, calibradores y controles.
- ❖ Volumen dispensado por pipetas mal calibradas.
- ❖ Energía de lámparas de medición.

Causas de error aleatorio

Las causas de errores aleatorios pueden ser:

- ❖ Cambios de voltaje.
- ❖ Burbujas al momento del pipeteo.
- ❖ Incorrecta homogenización de reactivos.
- ❖ Temperaturas de incubación inadecuadas.
- ❖ Variaciones por cambios de analistas.

En ocasiones este tipo de errores aparece y desaparece sin que el analista haya hecho nada especial y en estos casos es recomendable realizar un ensayo de verificación de precisión. Cada situación fuera de control resuelta debe registrarse, así como la acción correctiva y de ser posible desarrollar guías que faciliten la prevención de eventos futuros para ser resueltos sin contratiempos.

Programas de comparacion inter laboratorio

La participación en un programa inter laboratorio proporciona un mecanismo eficaz para complementar los programas de control de calidad interno. Genera una base de datos con la información de los laboratorios participantes, se forman grupos que comparten características similares y proporciona información estadística, que puede usarse para definir:

- ❖ Imprecisión intra laboratorio e inter laboratorio.
- ❖ Sesgo del laboratorio respecto a un grupo par.
- ❖ Relación entre imprecisión y sesgo relativo a los requisitos médicos.

5.5.2 Métrica Six Sigma

La métrica Six Sigma es una técnica de gestión de la calidad ampliamente aceptada, que en resumen se basa en la eliminación de defectos, específicamente determina el número de defectos que ocurren por millón de resultados u oportunidades en un proceso (DPMO o simplemente DPM). Este concepto tiene la finalidad de evaluar la calidad analítica mediante la precisión y exactitud observada y permite al laboratorio asegurar que los resultados de los métodos de ensayo cumplan con los estándares de calidad mínimos³⁷.

Generalmente se asume que los errores se presentan en un 62% en la fase pre analítica, 15% en la analítica y 23 % en la post analítica³⁶. Los errores en las fases pre y post analítica generalmente se cuantifican en porcentajes e indicadores y se eliminan mediante acciones correctivas, mientras que en el proceso analítico se evalúan parámetros como precisión y veracidad³⁸.

En todo proceso de medición existe cierto grado de error y los resultados del laboratorio no son la excepción. Razón por la cual existen en la literatura ETa para que el laboratorio pueda administrar y gestionar el error de cada prueba, es decir el error puede estar presente en cualquier momento y es responsabilidad del personal mantenerlo monitoreado y controlado³⁹. El valor de sigma indica con qué frecuencia es probable que se produzcan defectos, cuanto

mayor es el valor de sigma, es menos probable que se presenten defectos en el proceso. El rendimiento analítico de las pruebas se puede calcular mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Sigma: } (ETa - \text{BIAS}) / CV$$

5.6 Síndrome anti fosfolípidos

El término “anticuerpos antifosfolípidos” se usa para englobar a todos aquellos anticuerpos determinados por ELISA y mediante la prueba de AL. Las primeras descripciones acerca de las manifestaciones hematológicas y trombofílicas que definieron el síndrome antifosfolípidos fueron realizadas por Hughes⁴⁰ en 1875. Algunos de los aspectos históricos más relevantes se resumen en la **Tabla 1**.

5.6.1 Patogénesis

Es sabido que los afl reaccionan en contra de proteínas de unión en vez del fosfolípido sólo, siendo la β 2GP1 el auto antígeno más importante⁵³. La β 2GP1 es una de las proteínas más abundantes del plasma humano, es producida en grandes cantidades por el hígado y la placenta, sin embargo, no se conoce completamente su función fisiológica⁵⁴. Muchas evidencias señalan que los afl median la activación de la coagulación *in vivo* en modelos animales⁵⁵.

Algunos mecanismos propuestos son: 1) interacción de afl con células endoteliales mediante la unión a la β 2GP1 2) sobreexpresión de factor tisular en células endoteliales y monocitos, adhesión leucocitaria y síntesis de citocinas 3) agregación plaquetaria inducida por el reconocimiento de afl contra proteínas de superficie plaquetaria 4) interferencia de afl con la cascada de coagulación mediante la inhibición de mecanismos anticoagulantes naturales (proteína C, anexina V), inhibición de la fibrinólisis, activación plaquetaria, células endoteliales y monocitos^{56, 57, 58}. La primera teoría o “primer hito” ha sido sugerida como explicación del por qué existe trombosis ocasionalmente a pesar de la presencia persistente de afl, lo que incrementa el riesgo trombofílico^{59, 60} y por qué el trombo se presenta en un

segundo evento o “segundo hito” desencadenado por procesos inflamatorios principalmente aquellos relacionados con infecciones (**Figura 4**).

Tabla 1

Principales hechos históricos en la descripción del síndrome anti fosfolípidos.

Wasserman, 1906	Descubrió anticuerpos que denominó “reaginas” las cuales reaccionaban en contra de antígenos de células fetales hepáticas de pacientes con sífilis congénita ⁴¹ .
Landsteiner, 1907	Aisló de corazón bovino el mismo antígeno que Wasserman, implementando colesterol y lecitina ⁴² .
Pangborn, 1942	Le da nombre de “cardiolipina” al fosfolípido aislado a partir de corazón de res ⁴³ .
Moore, 1946	Describe casos de pacientes con VDRL falsamente positivos secundarios a infecciones virales, administración intravenosa de drogas y enfermedades autoinmunes ⁴⁴ .
Conley y Hartmann, 1952	Introducen el término anticoagulante lúpico para designar un inhibidor que alargaba las pruebas de coagulación en pacientes con LES ⁴⁵ .
Alarcón-Segovia, 1964	Describen casos de pacientes con eventos tromboticos, enfermedad vascular periférica, LES y prueba de VDRL falsamente positiva ⁴⁶ .
Hughes, 1975	Describe en un grupo de pacientes con meningitis, LES y serología falsa positiva para VDRL como síndrome anti cardiolipinas ^{47,48} .
Harris, 1983	Reemplazan el método de aglutinación para VDRL por un método de ELISA para la determinación de cardiolipinas y describen su hallazgo en otras patologías autoinmunes además de LES ⁴⁹ .
Gallí y McNeil, 1990	Se descubre que la unión de anticuerpos anti cardiolipina a un antígeno requiere a la β 2GP1 como cofactor de unión ⁵⁰ .
Asherson, 1992	Describió una forma grave o catastrófica de ésta enfermedad manifestada como coagulación diseminada en vasos pequeños que evolucionan rápidamente a falla orgánica múltiple ⁵¹ .
8° Simposio, 1998, Sapporo, Japón	Se establecen los primeros criterios diagnósticos del SAFL ⁶ .
Sozos Loizou y cols	Estandarizan un método de ELISA para cuantificar anticuerpos anti fosfolípidos ⁵² .
Congreso 2006	Se establece como criterio diagnóstico ¹⁰ la prueba de anticuerpos anti β 2GP1.

Estudios *in vitro* han demostrado que los afl reconocen la β 2GP1 expresada en membranas de células endoteliales causando alteración celular y generando un fenotipo pro coagulante y pro inflamatorio⁶¹. Este fenotipo pro coagulante puede deducirse por la demostración de: 1) aumento de la expresión del factor tisular, 2) inducción de la apoptosis celular y 3)

disminución de la actividad de mecanismos anticoagulantes, es decir disminución de la activación de proteína C y S, 4) secreción de citocinas pro inflamatorias⁶².

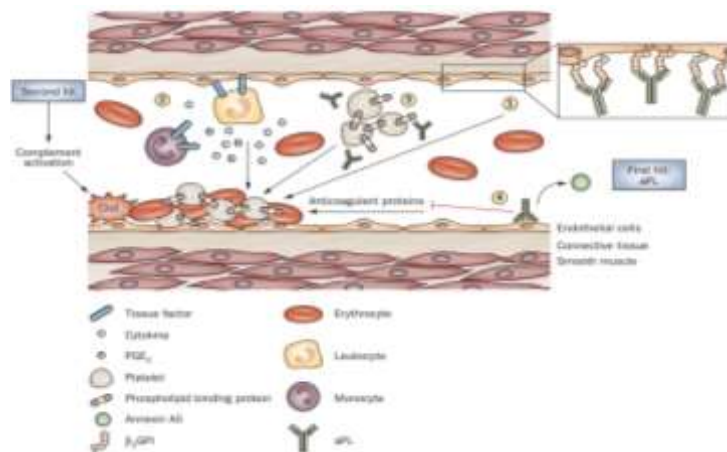


Figura 4. Mecanismo de formación de trombo mediado por anticuerpos afl. La interacción de afl con células endoteliales mediante la β 2GPI media la formación del trombo por aumento de la expresión de factor tisular, activación del complemento e inhibición de proteínas anticoagulantes.

Fuente: Meroni PL, Borghi MO, Raschi E et al. (2011) Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. *Nat Rev Rheumatol* 7:330-339.

5.6.2 Epidemiología

La prevalencia de afl en la población es de 1 y 5%, la cual aumenta con la edad⁶³. El SAFL es más frecuente en mujeres con una razón de 1 mujer por cada 7 hombres cuando está asociada a Lupus. Mientras que la incidencia se encuentra en 5 casos nuevos por cada 100,000 habitantes/año y la prevalencia entre 20 y 50 casos/100,000 habitantes. Aproximadamente el 1% de la población obstétrica sufre abortos de repetición, de las cuáles hasta un 15 % serán diagnosticadas con SAFL. La prevalencia de afl es de aproximadamente 50% en pacientes con LES. Por otro lado, enfermedades reumáticas como el síndrome de Sjögren, artritis reumatoide y dermatomiositis tienen una prevalencia de entre 5 y 20%.

5.6.3 Manifestaciones clínicas

El SAFL da lugar a una amplia variedad de manifestaciones tromboticas involucrando vasos simples y múltiples oclusiones vasculares^{64, 65, 66}. Algunas de las principales manifestaciones son:

- Trombosis venosa profunda
- Tromboflebitis superficial y trombosis arterial en extremidades inferiores
- Apoplejía
- Migraña
- *Livedo reticularis*
- Artralgia
- Artritis
- Embolismo Pulmonar
- Abortos y muerte fetal

5.6.4 Diagnóstico

Los criterios de clasificación para el síndrome antifosfolípidos establecen que se deben cumplir por lo menos un criterio clínico y uno de laboratorio¹⁰.

Criterios clínicos

1. Trombosis vascular

Uno o más episodios clínicos de trombosis arterial, venosa o de vasos pequeños, en cualquier tejido u órgano. La trombosis debe ser confirmada por criterios objetivos validados (es decir, hallazgos inequívocos de estudios de imagen o histopatología). Para la confirmación histopatológica, la trombosis debe estar presente sin evidencia significativa de inflamación en la pared del vaso.

2. Morbilidad del embarazo

(a) Una o más muertes inexplicadas de un feto morfológicamente normal en o más allá de la décima semana de gestación, con morfología fetal normal documentada por ultrasonido o por examen directo del feto, ó

b) uno o más nacimientos prematuros de un neonato morfológicamente normal antes de la 34ª semana de gestación debido a: (i) eclampsia o preeclampsia grave de acuerdo con definiciones estándar, o (ii) características reconocidas de insuficiencia placentaria ó

(c) tres o más abortos espontáneos consecutivos sin explicación antes de la décima semana de gestación, habiendo excluido alteraciones anatómicas/hormonales maternas y alteraciones cromosómicas paternas y maternas.

Criterios de laboratorio

1. Anticoagulante lúpico presente en el plasma, en dos o más ocasiones con al menos 12 semanas de diferencia, analizado de acuerdo con las directrices de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (Subcomité Científico de AL/Anticuerpos dependientes de fosfolípidos).
2. Anticuerpos aCl de isotipo IgG y/o IgM en suero o plasma, presentes en título medio o alto (es decir > 40 GPL o MPL, o > percentil 99), en dos o más ocasiones, con al menos 12 semanas de diferencia determinados por ELISA.
3. Anticuerpos anti β 2GP1 de isotipo IgG y/o IgM en suero o plasma (título > percentil 99), presente en dos o más ocasiones, con al menos 12 semanas de diferencia.

6. Objetivo general

- Verificar el desempeño analítico de anticuerpos anti cardiolipina y anti $\beta 2$ glicoproteína 1 de tipo IgA, IgM, e IgG en el autoanalizador Analyzer I-2P.

6.1 Objetivos específicos

- Establecer estrategias y el plan de control de calidad de acuerdo al documento C24 A2 del CLSI.
- Definir las metas analíticas o requisitos de calidad para cada una de los analitos.
- Estimar el Error Total del laboratorio y valores de Six Sigma.

7. Materiales y métodos

Todos los materiales necesarios para el procedimiento de análisis se encuentran listos para usarse en cada uno de los kits de ensayo para los tres isotipos (IgA, IgG o IgM) como se describe a continuación:

- ❖ Pocillos de microtitulación recubiertos con cardiolipina y $\beta 2$ glicoproteína-1.
- ❖ Calibradores.
- ❖ Control positivo y negativo.
- ❖ Conjugado enzimático (anti IgA, IgG o IgM humana).
- ❖ Buffer de muestra y de lavado.
- ❖ Solución Cromógeno/Sustrato.
- ❖ Solución de paro.

Analizador

Para realizar las determinaciones se utilizó el autoanalizador Analyzer I-2P de la casa comercial EUROIMMUN (Alemania).

Metodología

Verificación del desempeño

Los analitos se determinaron mediante Inmunoensayo Absorbente Ligado a Enzimas de tipo colorimétrico. Se utilizó la guía EP15-A2 del CLSI para evaluar precisión y veracidad, la guía

de la EMA para la evaluación de la linealidad y la guía del Centro Nacional de Metrología para el cálculo de incertidumbre. Se analizaron dos niveles (alto y bajo) de cada prueba para aCl IgA, IgG e IgM y anti β 2GP1 IgA, IgG e IgM.

Precisión

Se realizaron determinaciones por triplicado en cinco corridas diferentes durante cinco días consecutivos (esquema de $n=3 \times 5$). Se obtuvieron 15 datos al final de los cinco días por cada nivel, se calculó la precisión intra laboratorio (SI) y el valor de repetibilidad (Sr), se determinó el valor de verificación con el fin de determinar si existían diferencias estadísticamente significativas sólo en el caso de que SI y Sr fueran mayores a la precisión declarada por el fabricante, SDI y SDr respectivamente.

Veracidad

Se realizaron determinaciones por duplicado en cinco corridas diferentes durante cinco días consecutivos (esquema de $n=2 \times 5$). Se obtuvieron 10 datos al final de los cinco días por cada nivel. Se calculó la media y desviación estándar de cada nivel de concentración; para validar el valor de veracidad se determinó el intervalo de verificación mediante el cálculo de la incertidumbre estándar de la medición.

Linealidad

Se ocuparon sueros de pacientes de concentraciones altas (≥ 40 U/mL y ≥ 40 UR/mL para aCl y β 2GP1 respectivamente). Se realizaron 4 diluciones dobles y 3 replicados por cada dilución. Se calculó el valor de la pendiente, ordenada al origen y coeficiente de correlación.

Definición de requisitos de calidad

Se calculó el Error total del laboratorio y se revisó en la literatura los límites analíticos de desempeño disponibles para el control estadístico.

Selección de estrategias de control

Se calcularon los puntos operativos, valor de Sigma y se seleccionaron las reglas de control con ayuda de gráficos de operación de procesos (OPSpecs). Se construyeron las gráficas de Levey-Jennings del material de control positivo durante el año 2017.

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron en una hoja de cálculo de Excel así como en la versión de prueba de los programas EP Evaluator y NCSS 12.

8. Resultados

Verificación del desempeño

Precisión. Para determinar la precisión intra laboratorio Sl y precisión intra corrida Sr se realizaron determinaciones por triplicado durante 5 días consecutivos (Ver **Figura 5 y 6**) de dos materiales: control positivo (control alto) y calibrador nivel 2 de la curva de calibración (nivel bajo).

Se calculó Sl y Sr de los 6 analitos en ambos niveles, se comparó con los valores de precisión SDI y SDr respectivamente declarados por el fabricante. El criterio de aceptación es:

$$Sl \leq SDI \quad y \quad Sr \leq SDr$$

Se calculó el valor de verificación para determinar si las diferencias eran estadísticamente significativas en aquellos analitos en que Sl fuera mayor a SDI o Sr mayor a SDr . Los resultados de ambos niveles se muestran en la **Tabla 2**.

Veracidad. Se realizaron determinaciones por duplicado durante 5 días consecutivos (en las mismas corridas en la que se realizó el ensayo de precisión), de acuerdo al documento EP15-A2 del CLSI. El valor asignado al material de calibrador se obtuvo de los certificados provistos por el fabricante, sin embargo, no existen incertidumbres asociadas al calibrador disponibles en los insertos de las pruebas. Se calculó la incertidumbre estándar (u) de acuerdo a la guía del CENAM de cada nivel, los límites superior e inferior del intervalo de verificación, porcentaje de BIAS y porcentaje de recuperación. Sólo en el control alto de anticuerpos aCl IgA no fue posible demostrar la veracidad por este método. El porcentaje de recuperación de cada prueba se muestra en las **Tablas 3 y 4** y en la **Figura 7**.

Linealidad. Se prepararon una serie de 4 diluciones dobles a partir de sueros de pacientes con títulos altos, cada dilución se determinó por triplicado en una sola corrida analítica, de acuerdo al protocolo emitido por la EMA. Se calcularon las medias de cada dilución, la pendiente m , ordenada al origen b y el coeficiente de correlación r (**Figura 8**). Para aceptar el ensayo de linealidad, el criterio de aceptación es: r de al menos 0.99, es deseable que la pendiente sea de 1.00 y la ordenada al origen de 0 (**Tabla 5**).

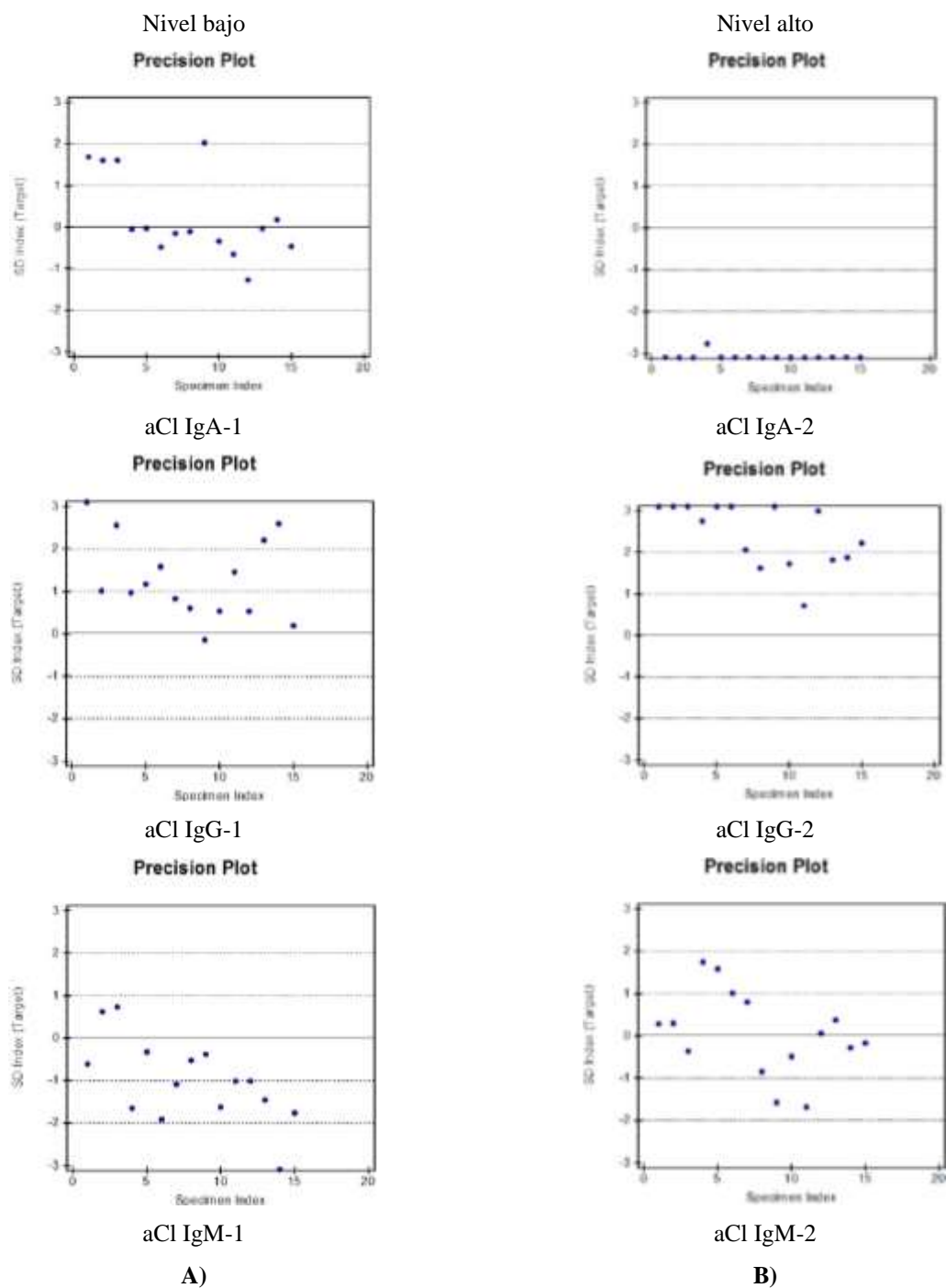


Figura 5. Evaluación de precisión para anticuerpos aCl. **A) Nivel bajo.** Sólo los anticuerpos aCl IgA-1 muestran una distribución normal, mientras que aCl IgG-1 y aCl IgM-1 tienen una tendencia hacia arriba y abajo de la media respectivamente. **B) Nivel alto.** Los anticuerpos aCl IgA-2 tienen una distribución cerca de las 3 desviaciones estándar hacia abajo mientras que los anticuerpos aCl IgG-2 con tendencias hacia arriba cercana a los límites superiores.

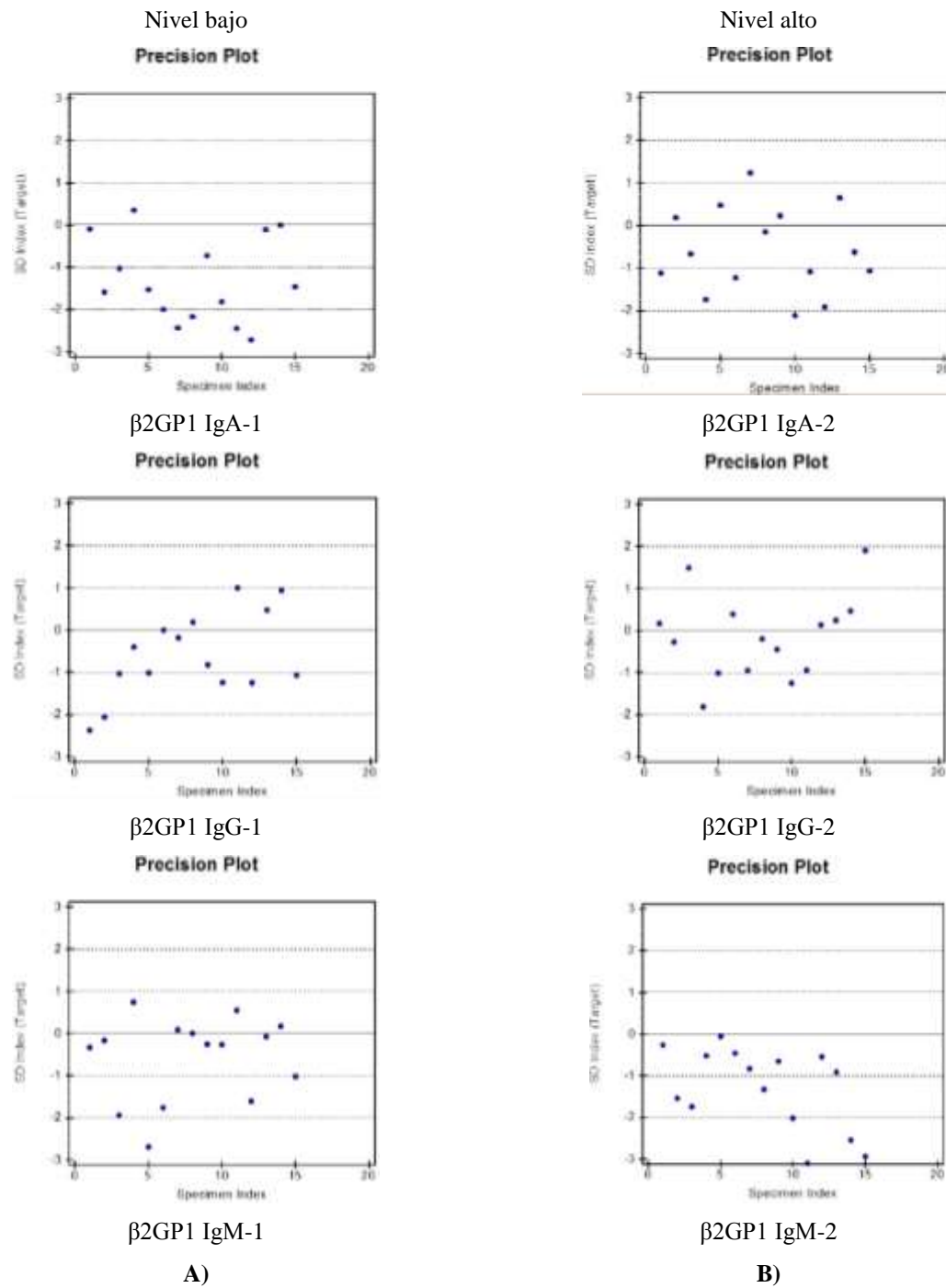
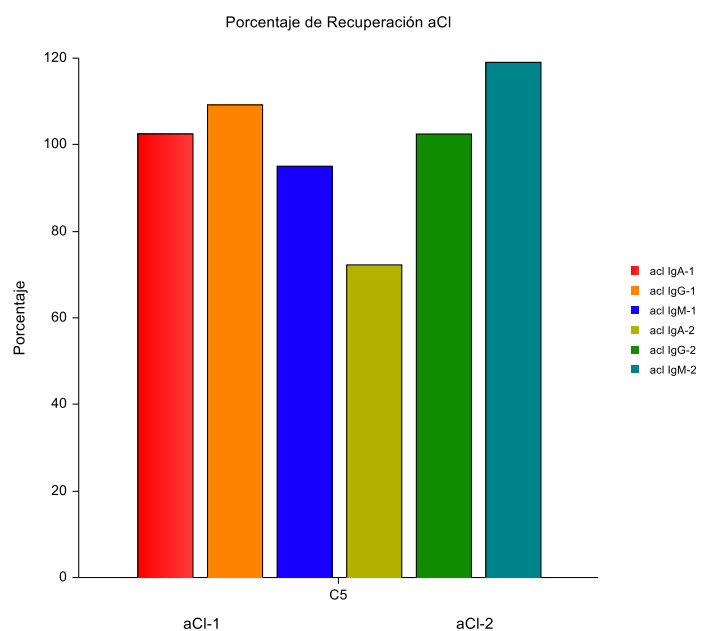
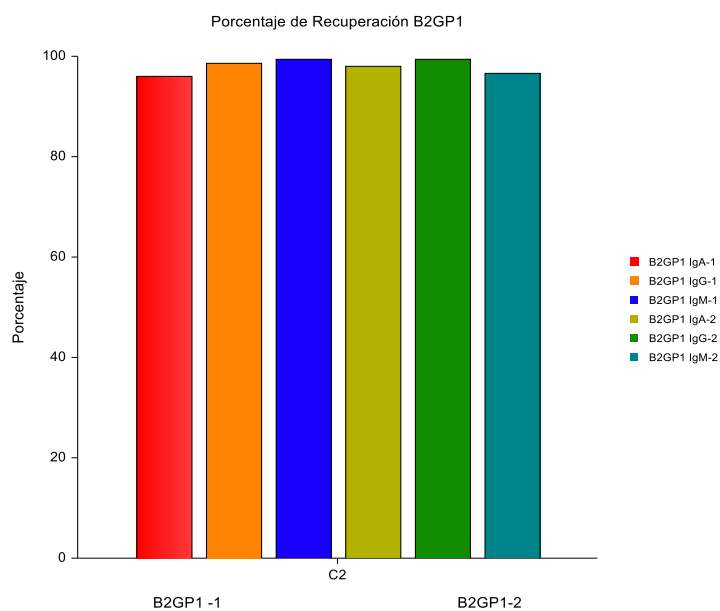


Figura 6. Evaluación de precisión para anticuerpos anti β2GP1. A) Nivel bajo. Únicamente los anticuerpos anti β2GP1 IgA-1 tienen resultados por debajo de la media, mientras que las dos pruebas restantes una distribución normal. **B) Nivel alto.** Sólo los anticuerpos anti β2GP1 IgM-2 tienen resultados sesgados hacia abajo.

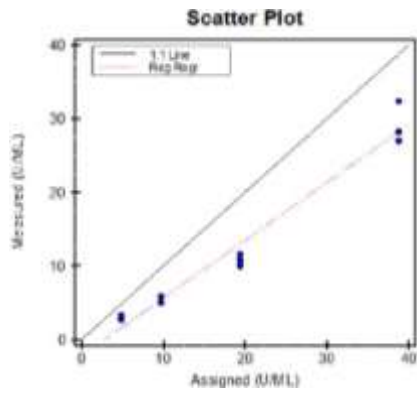


A)

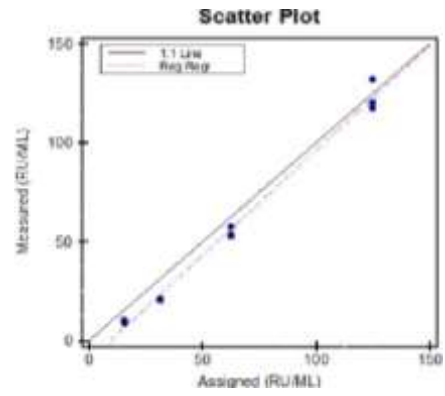


B)

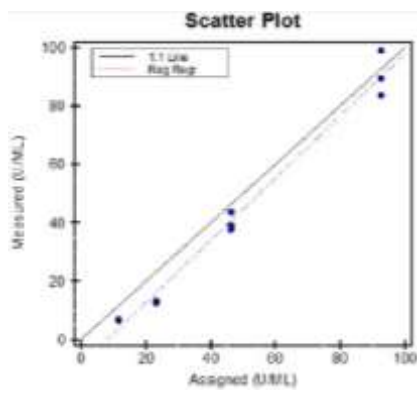
Figura 7. Evaluación de veracidad para: A) Anticuerpos aCl. Los porcentajes mínimos de 68% y máximos de 122% muestran los grandes sesgos respecto al valor verdadero. **B) Anticuerpos anti β 2GP1.** Tanto niveles bajos como altos de β 2GP1 tienen una recuperación muy cercana al 100% y tienen los porcentajes de sesgo más pequeños.



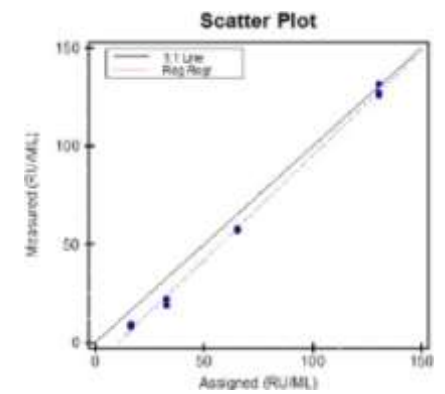
aCl IgA



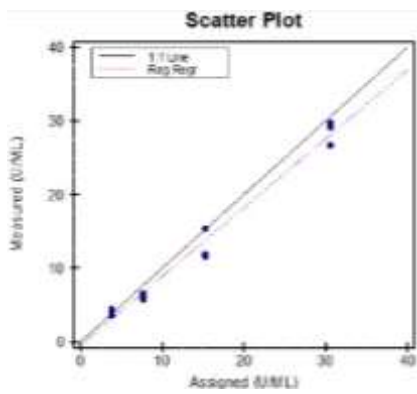
β 2GP1 IgA



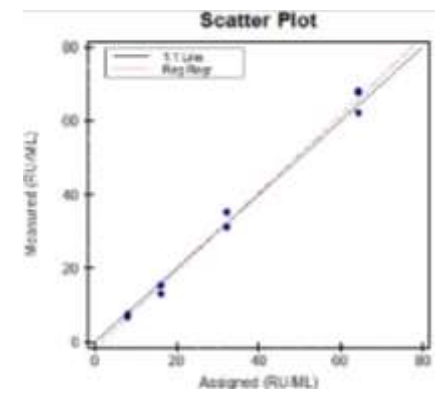
aCl IgM



β 2GP1 IgM



aCl IgG



β 2GP1 IgG

A)

B)

Figura 8. Evaluación de linealidad para: A) Anticuerpos aCl, B) Anticuerpos anti β 2 GP1. Todas las pruebas son lineales con al menos un coeficiente de correlación r de 0.99.

Tabla 2**Resultados del proceso de verificación de precisión.**

Analito	Concentración del inserto (U/ml)	Concentración obtenida (U/ml)	% CV (Obtenido)	%CV (Inserto)	SI	SDI	Sr	SDr	V.V. SDI	V.V. SDr
aCl IgA-1*	12	12.3	11.9	11.3	1.4	2.0	0.8	1.7	NA	NA
aCl IgG-1*	12	13.5	9.8	10.4	1.2	2.7	1.0	2.4	NA	NA
aCl IgM-1*	12	11.3	6.3	10.1	0.8	3.0	0.5	4.6	NA	NA
aCl IgA-2**	65	44.8	7.4	9.6	4.8	6.9	4.8	4.7	NA	6.9
aCl IgG-2**	74	75.3	8.3	8.5	6.1	6.7	4.3	4.6	NA	NA
aCl IgM-2**	75	91.9	9.4	9.9	7.0	7.4	5.3	4.4	NA	6.5
anti β2GP1 IgA-1*	20	18.9	4.2	3.8	0.8	2.7	0.7	1.5	NA	NA
anti β2GP1 IgG-1*	20	19.5	3.9	6.9	0.8	4.0	0.7	4.4	NA	NA
anti β2GP1 IgM-1*	20	19.3	5.9	10.5	1.2	2.7	1.3	2.5	NA	NA
anti β2GP1 IgA-2**	97	94.3	4.8	5	4.6	5.8	3.7	4.6	NA	NA
anti β2GP1 IgG-2**	105	104.4	3.9	7.6	4.1	8.9	3.4	7.5	NA	NA
anti β2GP1 IgM-2**	103	98.4	3.5	6.6	3.6	4.8	3.0	3.6	NA	NA

* Nivel bajo/valor de corte de cada prueba.

**Nivel alto/Control positivo.

V.V SDI: Valor de Verificación de precisión intra laboratorio.

V.V SDr: Valor de Verificación intra corrida.

Tabla 3**Resultados de veracidad para anticuerpos anti β 2GP1 IgA, IgG e IgM.**

	Nivel bajo			Nivel alto		
	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM
Anticuerpos anti β2GP1						
Concentración obtenida (UR/mL)	18.9	19.5	19.3	94.3	104.4	98.4
Concentración del Inserto (UR/mL)	20	20	20	97	105	103
Incertidumbre (u)	0.20	0.19	0.29	1.12	0.99	0.88
%BIAS	5.4	2.3	3.5	2.8	0.5	4.5
BIAS (UR/mL)	-1.1	-0.5	-0.7	-2.7	-0.6	-4.6
% de Recuperación	94.5	97.5	96.5	97.2	99.4	95.5
Intervalo de Verificación	16.7-21.1	17.5-21.6	16.1-22.5	82.2-106.5	93.6-115.2	88.8-108.0

Tabla 4**Resultados de veracidad para anticuerpos aCL IgA, IgG e IgM.**

	Nivel bajo			Nivel alto		
	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM
Anticuerpos anti cardiolipina						
Concentración obtenida (U/mL)	12.3	13.5	11.3	44.8	75.3	91.9
Concentración del inserto (U/mL)	12	12	12	65	74	75
Incertidumbre (u)	0.34	0.28	0.18	1.19	1.47	1.7
%BIAS	2.6	12.4	6.1	31.1	1.7	22.6
BIAS (U/mL)	0.3	1.5	-0.7	-20.2	1.3	16.9
% de Recuperación	102.5	112.5	94.1	68.9	101.7	122.5
Intervalo de Verificación	8.6-16.0	10.4-16.6	9.3-13.2	31.78-57.7	59.3-91.2	73.5-110.4

Tabla 5

Resultados del análisis de linealidad para anticuerpos aCl y anti β 2GP1

	Anticuerpos aCl						Anticuerpos anti β 2GP1					
	IgA		IgG		IgM		IgA		IgG		IgM	
	%	Obtenida	%	Obtenida	%	Obtenida	%	Obtenida	%	Obtenida	%	Obtenida
	100	77.65	100	61.12	100	180.2	100	246	100	128.75	100	256
Promedio Dilución 1:2	50	29.2	50	28.5	50	90.1	50	123.3	50	66.07	50	128.3
Promedio Dilución 1:4	25	10.8	25	12.94	25	40.1	25	54.7	25	32.6	25	57.5
Promedio Dilución 1:8	12.5	5.31	12.5	6.15	12.5	12.9	12.5	20.6	12.5	14.6	12.5	20.9
Promedio Dilución 1:16	6.25	2.9	6.25	4.06	6.25	6.6	6.25	9.73	6.25	7.02	6.25	8.9
m	0.809		0.618		1.88		2.55		1.30		2.66	
b	-6.18		-1.40		-6.99		-8.10		-0.655		-8.98	
r	0.984		0.998		0.999		0.999		0.999		0.999	

Evaluación del desempeño y selección de reglas de control

Con los datos obtenidos del proceso de verificación, se determinó el Error Total del laboratorio (ETlab), %BIAS, coeficiente de variación y valor de sigma (Tabla 6). Se seleccionaron sólo los controles positivos para realizar el esquema de control (Tabla 7), es decir las reglas necesarias para el proceso, número de controles y repeticiones por corrida analítica con ayuda de los gráficos OPSpecs (Figura 9).

Tabla 6

Resumen de parámetros del desempeño.

Analito	%BIAS	%CV	ETlab (%)	ETa (%)	Sigma
aCl IgA-1	2.6	11.9	26.5	20	1.5
aCl IgG-1	12.4	9.8	32	20	0.8
aCl IgM-1	6.1	6.3	18.7	20	2.2
anti β2GP1 IgA-1	5.4	4.2	13.8	20	3.5
anti β2GP1 IgG-1	2.3	3.9	10.2	20	4.5
anti β2GP1 IgM-1	3.5	5.9	15.2	20	2.8
aCl IgA-2	31.1	7.4	45.9	20	-1.5
aCl IgG-2	1.7	8.3	18.2	20	2.2
aCl IgM-2	22.6	9.4	41.4	20	0.3
anti β2GP1 IgA-2	2.8	4.8	12.3	20	3.6
anti β2GP1 IgG-2	0.5	3.9	8.3	20	5
anti β2GP1 IgM-2	4.5	3.5	11.5	20	4.4

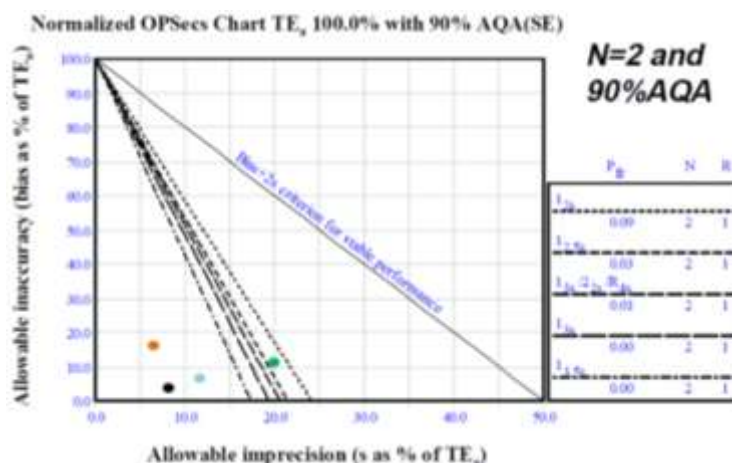


Figura 9. Gráfico OPSpecs. Selección de reglas para control del proceso. aCl IgG (verde), anti β2GP1 IgA (azul), anti β2GP1 IgG (negro), anti β2GP1 IgM (anaranjado).

Tabla 7

Esquema de control de calidad interno

Analito	ETa (%)	Pde%	Pfr %	N	R	Reglas de control
aCl IgA	20	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
aCl IgG	20	90	0.03	2	1	1 _{2.5s}
aCl IgM	20	90	N/A	N/A	N/A	N/A
anti β2GP1 IgA	20	90	0	2	1	1 _{3.5s}
anti β2GP1 IgG	20	90	0	2	1	1 _{3.5s}
anti β2GP1 I gM	20	90	0	2	1	1 _{3.5s}

Gráficas de control de calidad interno

Se construyeron las gráficas del control positivo del año 2017 para anticuerpos aCl IgA, IgG e IgM y anti β2GP1 IgA, IgG e IgM (Figura 11 y 12). El coeficiente de variación mensual es menor en todos los casos al 20% (Figura 10).

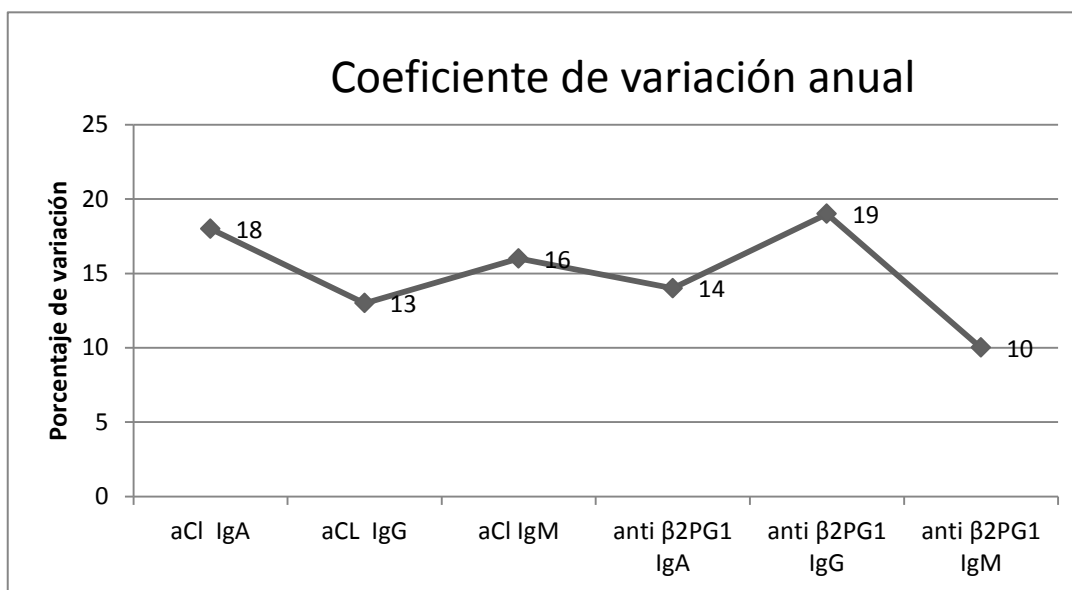


Figura 10. Coeficientes de variación para anticuerpos aCl y anti β2GP1. Se muestran el coeficiente de variación total durante un año para cada prueba donde en todo caso es menor al 20%.

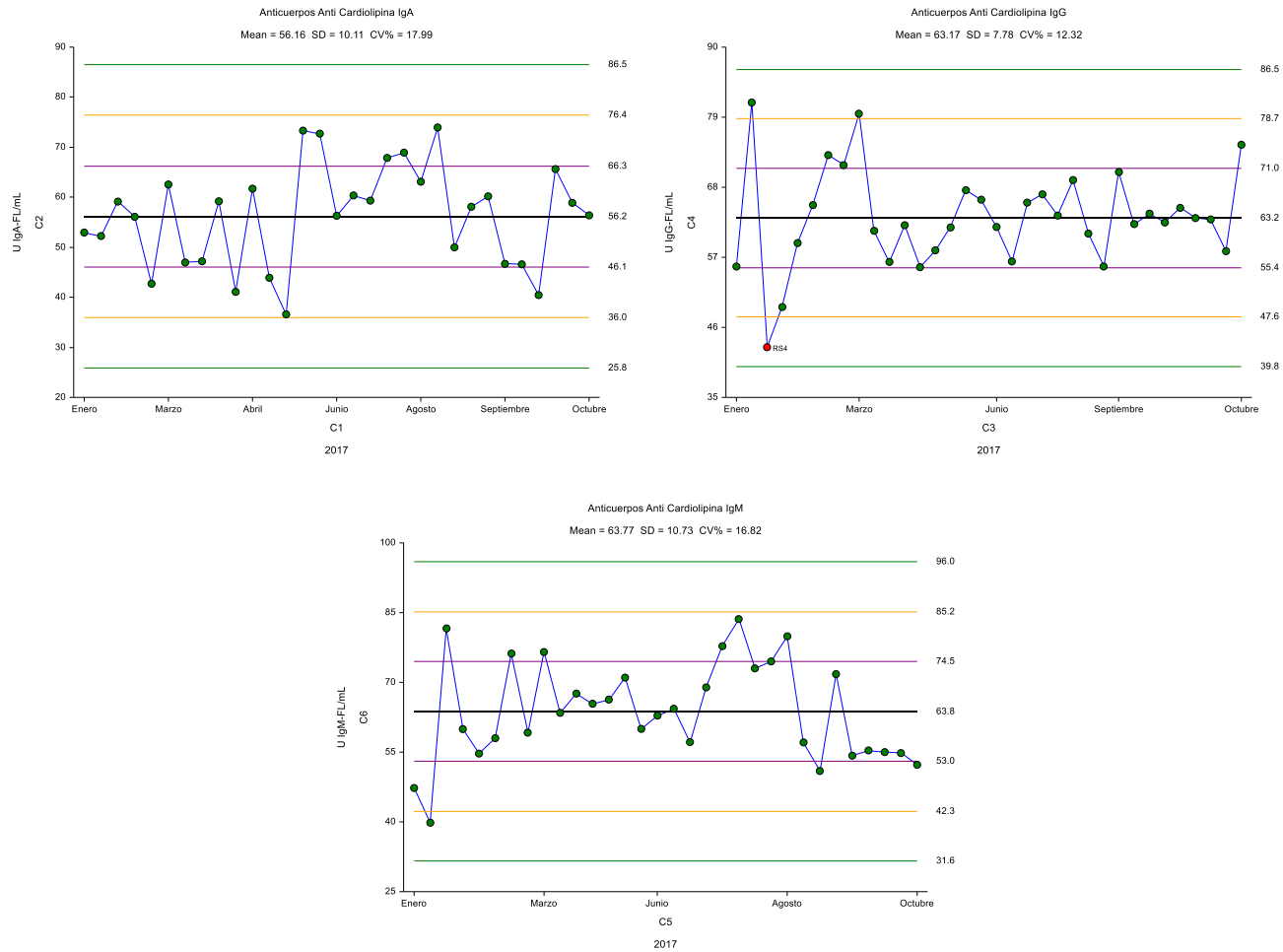


Figura 11. Gráficas de control para anticuerpos aCl. Las gráficas de control del 2017 muestran que los controles no violan las reglas establecidas como criterio de rechazo para corridas. Solo una violación de regla 41S para anticuerpos anti cardiolipina IgG.

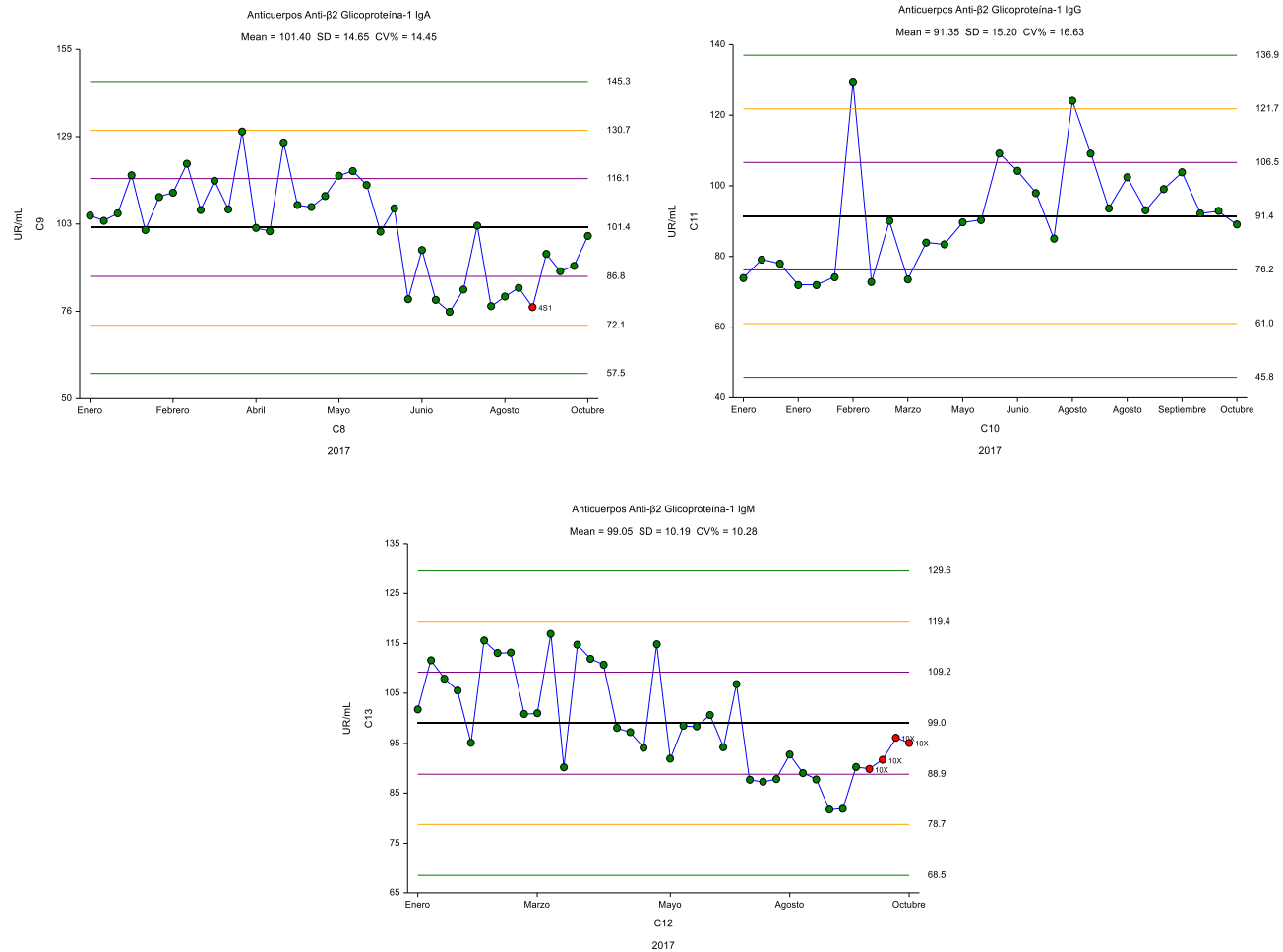


Figura 12. Gráficas de control para anticuerpos anti β2GPI1. Gráficas de control de 2017 donde existen 4 y 10 valores consecutivos por debajo del mismo lado de la media para anticuerpos IgA e IgM respectivamente, violando reglas que indican errores sistemáticos.

9. Discusión de resultados

Precisión. Con los resultados obtenidos, se calculó la precisión intra corrida e intra laboratorio y se comparó con la declarada por el fabricante. Únicamente los anticuerpos aCl IgA-2, y aCl IgM-2 tuvieron valores de Sr mayores a SDr , se calculó el valor de verificación (V.V.SDr) con el fin de determinar si las diferencias eran estadísticamente significativas. En la **Tabla 2** se observa que en todos los casos el valor de Sr es menor al valor de verificación, razón por la cual queda verificado que los resultados de precisión son conformes a lo declarado por el fabricante y adecuados para su uso en pacientes²⁹. Todos los valores de Sl y Sr de anticuerpos anti β 2GP1 son menores a los del fabricante y no se necesita más análisis de verificación. Existe un % CV inter ensayo de 5 días menor a 10% en los 6 analitos ensayados, valor que es apropiado de acuerdo a las recomendaciones de guías internacionales^{66, 67} para anticuerpos aCl y anti β 2GP1.

Veracidad. Se calculó la media de cada nivel y el valor de verificación de acuerdo a la concentración declarada por el fabricante, se obtuvo el %BIAS y porcentaje de recuperación de cada material analizado. La única incertidumbre disponible fue la calculada (incertidumbre estándar) de acuerdo a la guía del CENAM debido a que no fue posible conocer más fuentes de incertidumbre.

En todas los analitos se cumple el criterio de aceptación (la media del inserto debe estar dentro del intervalo de verificación), además el porcentaje de recuperación es cercano al 100% y se demuestra conformidad con los criterios de verificación de veracidad (Tabla 3 y 4). Sin embargo, lo anterior no se cumple para el control positivo de anticuerpos aCl IgA donde el nivel declarado por el fabricante es de 65 PL Ig U/mL y el promedio obtenido fue de 45 PL Ig U/ml (intervalo de verificación de 31.78-57.74), es decir un % BIAS de 31%, la recuperación del material de control fue solo 68%. Para este analito el valor obtenido aún se encuentra dentro del intervalo de verificación y lo indicado de acuerdo al documento EP15-A2 es repetir el experimento con un mayor número de muestras o analizar en el contexto clínico si un resultado con 31% de sesgo respecto al valor verdadero es clínicamente significativo. Se necesita acción correctiva y la asistencia del fabricante para resolver la aceptabilidad de la veracidad para anticuerpos anti cardioplipina IgA²⁹.

Los valores diagnósticos de anticuerpos aCl para el SAFL se encuentran en 40 PL Ig U/mL, es decir valores medios/altos. El impacto sobre la decisión clínica es muy importante en valores cerca de niveles de decisión clínica o cerca del punto de corte, situación donde la interpretación de resultados es más apropiada de acuerdo a la historia clínica del paciente y siguiendo algoritmos de diagnóstico⁶⁸. Debido a que no existen valores de ETa, no es posible establecer límites de desempeño clínico.

Linealidad. Para demostrar linealidad se siguió el protocolo de la guía de la EMA, debido a que la guía del CLSI requiere realizar más diluciones y más número de muestras, además de que son requeridos cálculos más complejos que involucran el uso de programas estadísticos específicos para evaluar los resultados. Se calculó la media de cada dilución y se realizó el análisis de regresión lineal. Los parámetros obtenidos fueron coeficiente de correlación r , ordenada al origen b y pendiente m , el único criterio de aceptación es r de al menos 0.99. Todas las pruebas tienen comportamiento lineal con r de 0.99, (aCl IgA de 0.984) con lo que se demuestra la linealidad de los 6 analitos y se concluye con la verificación (Tabla 5).

Desempeño. La precisión y veracidad en términos de coeficiente de variación y sesgo respectivamente demuestran la exactitud y utilidad clínica de anticuerpos aCl y anti β 2GP1. El sistema analítico tiene exactitud a pesar de que se ha demostrado la gran variabilidad en las determinaciones entre diferentes laboratorios y diferentes marcas comerciales⁶⁹.

Error Total y valor de Sigma. Los analitos con mayor porcentaje de error fueron los niveles altos de aCl IgA e IgM con 45% y 41% respectivamente, siendo el promedio de 16% para el resto de las pruebas. Los anticuerpos anti β 2GP1 resultaron en tener los porcentajes de error más pequeños en ambos niveles. En la literatura no hay disponible datos acerca del ETa para anticuerpos aCl ni para anticuerpos anti β 2GP1, sin embargo está establecido en guías internacionales^{13, 66, 67} mantener un %CV inter corrida menor a 20%, por lo que se decidió establecer este valor como ETa, asumiendo un porcentaje de sesgo de 0%.

Reglas de control. Se decidió realizar la planeación del control de calidad sólo para los controles altos de anticuerpos aCl y anti β 2GP1 debido a que el nivel de decisión clínica según las guías clínicas es de 40 U/ml.

Se obtuvieron los puntos operativos y las reglas de control aplicables al desempeño de los controles positivos mediante los gráficos OPSpecs. Sin embargo, para los anticuerpos aCl IgA e IgM ninguno de los procedimientos con $N=2$ proporciona un adecuado porcentaje de detección de errores y su ubicación en la gráfica indican un desempeño inaceptable para el ETa establecido. Para anticuerpos aCl IgG la regla obtenida fue $1_{2.5s}$, una probabilidad de falso rechazo de 3% con $N=2$, $R=1$ y 90% de detección de errores. Para anticuerpos anti β 2GP1 IgA, IgG e IgM fue $1_{3.5s}$, una probabilidad de falso rechazo de 0% con $N=2$ y $R=1$ y 90% de detección de errores. Se construyeron las gráficas de control de calidad del control positivo durante 2017 en la versión de prueba del programa NCSS12 y en ningún caso se violan las reglas establecidas.

Se encontró únicamente la violación de reglas que indican errores sistemáticos, 4_{1s} y $10X$ para anticuerpos anti β 2GP1 IgA y IgM respectivamente; una violación de R_{4s} para anticuerpos aCl IgG; debido a que en ningún otro dato de la gráfica se observa comportamiento similar, se asume como error aleatorio.

Todos los analitos tienen un %CV menor a 20 %, valor que es adecuado según guías internacionales^{66, 67} y puede ser usado como meta analítica válida en el control de calidad interno. El proceso de verificación es especialmente importante cuando los controles comerciales de las pruebas son *in kit*, (como es el caso de los kits usados para este trabajo), es decir son fabricados por la misma casa comercial de los reactivos y calibradores, por lo que es necesario comprobar mediante evidencia objetiva (procedimientos aprobados) que los resultados son realmente precisos y veraces.

10. Conclusiones

Los resultados de anticuerpos antifosfolípidos en el laboratorio de Inmunología son veraces, precisos y por lo tanto exactos para apoyar al diagnóstico del síndrome antifosfolípidos.

Los coeficientes de variación intra ensayo con los kits de la marca EUROIMMUN son menores al 10%, adecuados a lo recomendado para las determinaciones por ELISA.

Los coeficientes de variación durante 2017 son adecuados al 20% máximo recomendado por las guías de consenso internacionales para afl.

Los datos del proceso de verificación y del control de calidad cumplen con los requisitos para que el laboratorio pueda lograr la acreditación bajo la norma ISO 15189 en estas pruebas.

La implementación de un programa de comparación inter laboratorios y la búsqueda de un control de tercera opinión es importante al menos en las instituciones locales con el fin de conocer el desempeño de las pruebas, crear grupos consenso y realizar de mejor manera la evaluación de resultados control.

Es necesario establecer puntos de corte propios del laboratorio así como valores normales basados en el percentil 99.

11. Referencias

1. Meroni PL, Borghi MO, Raschi E et al. (2011) Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. *Nat Rev Rheumatol* 7:330-339.
2. Amengual O, Atsumi T, Koike T. (2004) Antiprothrombin antibodies and the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Clin Immunol* 112:144-149.
3. Favaloro EJ, Silvestrini R. (2002) Assessing the usefulness of anticardiolipin antibody assays: a cautious approach is suggested by high variation and limited consensus in multilaboratory testing. *Am J Clin Pathol* 118: 548-57.
4. Robert JM, Macara LM, Chalmers EA, Smith GC. (2002) Inter-assay variation in antiphospholipid antibody testing. *BJOG* 109: 348-9.
5. Reber G, Arvieux J, Comby E, et al. (1995) Multicenter evaluation of nine commercial kits for the quantitation of anticardiolipin antibodies. The Working Group on Methodologies in Haemostasis from the GEHT (Groupe d'Etudes sur l'Hemostase et la Thrombose). *Thromb Haemost* 73: 444-2.
6. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, et al. (1999) International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 42: 1309-11.
7. Triplett DA. (2002) Antiphospholipid antibodies. *Arch Pathol Lab Med* 126: 1424-9.
8. ISO 15189:2012 Medical laboratories Requirements for quality and competence.
9. CLSI (1996) Performance goals for the internal quality control of multichannel hematology analyzers; Approved Standard Document H26-A 16(12).
10. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. (2006) International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 4:295-306.
11. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, et al. (1983) Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systematic lupus erythematosus. *Lancet* 26:1211-4.
12. Hughes GRV. (1999) Hughes syndrome the syndrome behind the name (otherwise known as antiphospholipid syndrome). *Isr Med Ass J* 1: 100-103.
13. Wong RC, Favaloro EJ, Pollock WA. (2004) Multi-centre evaluation of the intra-assay and inter-assay variation of commercial and in-house anti-cardiolipin antibody assays. *Pathology* 36: 182-192.
14. Coulam CB, McIntyre JA, Wagenknecht D, Rote N. (1990) Interlaboratory inconsistencies in detection of anticardiolipin antibodies. *Lancet* 335: 865.

15. Shewhart, WA. (1931) Economic Control of Quality of Manufactured Products. Van Nostrand Company Inc.
16. Entidad Mexicana de Acreditación. Listado de laboratorios clínicos acreditados. México. 2018. Disponible en http://consultaema.mx:75/Directorio_CL/Principal.aspx [Consultado 1 Septiembre 2018]
17. ISO 9001:2015 Quality management systems requirement.
18. Guajardo E. (2008). Conceptos y enseñanzas de los grandes maestros de la calidad. Administración de la calidad total. Editorial Panorama. México.
19. Munch L. (2005) Calidad y mejora continua. Principios para la competitividad y la productividad. México: Trillas.
20. NMX-CC-9001-IMNC-2015 Sistemas de gestión de la calidad-requisitos.
21. Nillson Orsini J. (2013). The Essential Deming: Leadership Principles from the Father of Quality W. Edwards Deming. Mc-Graw Hill.
22. Deming, E. (1989). Calidad, Productividad y competitividad, La Salida de la crisis. Madrid, España: Editorial de Santos S.A.
23. Entidad Mexicana de Acreditación. La Acreditación y sus beneficios. México. 2018. Disponible en: http://www.ema.org.mx/portal_v3/index.php/la-acreditacion-y-sus-beneficios. [Consultado 1 Septiembre 2018]
24. Vocabulario Internacional de Metrología (2012). CEM; 3^{era} edición.
25. Entidad mexicana de Acreditación, Centro Nacional de Metrología. (2008) Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico.
26. Westgard O. James. (2003). Basic Method Validation. 2nd. Edition. pp.29-30, 87-99, 111-122.
27. NCCLS. (2003). Document EP6-A: Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline.
28. CLSI EP05A3 Evaluating Quantitative Measurement Precision, 3rd Edition
29. CLSI. (2006). EP-15-A2. User verification of performance for precision and trueness. Clinical Laboratory Standards Institute.
30. Gutiérrez PH. (2005). Calidad total y productividad. 2^a Ed. México: McGrawHill.

31. CLSI. (1999). C24 A2 Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures. Clinical and Laboratory Standards Institute.
32. Burnett RW, Westgard JO. (1992) Selection of measurement and control procedures to satisfy HCFA requirements and provide cost-effective operation. *Arch Pathol Lab Med.* 116:777-782.
33. Skendzel LP, Barnett RN, Platt R. (1985) Medically useful criteria for analytical performance of laboratory tests. *Am J Clin Pathol* 83:200-205.
34. CLSI EP18-3P. Risk Management Techniques to Identify and Control Laboratory Error Sources Proposed Guidelines, 2009 Third Edition.
35. Tetrault GA, Steindel SJ. (1994) Daily quality control exception practices. Chicago, IL.: College of American Pathologists, Q-Probe 94-08.
36. Seehafer, JS. (1997) Corrective Actions: What to do when control results are out of control. *Med Lab Observ* 29 (3):34-40.
37. Westgard JO, Six Sigma QC Design and Control, 2nd edition, Westgard QC, Madison WI, 2008.
38. Westgard JO, Carey RN, Wold S. (1974) Criteria for judging precision and accuracy in method development and evaluation. *Clin Chem* 20:825-33.
39. Westgard JO, Seehafer JJ, Barry PL. (1994) Allowable imprecision for laboratory tests based on clinical and analytical test outcome criteria. *Clin Chem* 40:1909-14.
40. Antonio IG, José R, Carlos T, Federico R, Vinicio CC, Uriel P, et al (2008) Historiografía de los diferentes eventos que entrelazan la estructuración del síndrome antifosfolípido. *Rev.Colomb.Reumatol* 15(4): 229-270.
41. Wassermann A, Neisser A, Bruck C. (1906) Eine serodiagnostische reaktion bei syphilis. *Dtsch Med ochenschr* 32:745.
42. Landsteiner K. Muller R, Potzl D. (1907) Studies on the complement binding reaction in syphilis. *Wien Klin Wschr* 20: 1565.
43. Pangborn MC. (1941) A new serologically active phospholipid from beef heart. *Proc Soc Exp Biol* 48:484-6.
44. Moore JE, Lutz WB. (1955) The natural history of systemic lupus erythematosus: an approach to its study through chronic biologic false positive reactors. *J Chronic Dis* 1:297-316.
45. Conley CL, Hartmann RC. (1952) A Hemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. *J Clin Invest* 31:621-622.
46. Alarcón-Segovia D, Osmundson PJ. (1965) Peripheral vascular syndromes associated with systemic lupus erythematosus. *Ann Intern Med* 62: 907-919.

47. Hughes GRV. (1983) Thrombosis, abortion, cerebral disease and the lupus anticoagulant. *Br Med J* 287:1088-9.
48. Wilson WA, Hughes GR. (1975) Letter: A etiology of Jamaican neuropathy. *Lancet* 1: 345.
49. Harris EN, Asherson RA, Gharavi AE, Morgan SH, Derue G, Hughes GR. (1985) Thrombocytopenia in SLE and related autoimmune disorders: association with anticardiolipin antibody. *Br J Haematol* 59: 227-230.
50. Galli M, Comfurius P, Maassen C, et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 1990;335:1544-7. 15.
51. Asherson RA. (1988) A "primary" antiphospholipid syndrome? *J Rheumatol* 15:1742-6.
52. Loizou S, McCrea JD, Rudge AC, Reynolds R, Boyle CC, Harris EN. (1985) Measurement of anticardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): standardization and quantitation of results. *Clin Exp Immunol* 62:738-745.
53. De Laat, B, Mertens, K, De Groot, PG. (2008) Mechanisms of disease: antiphospholipid antibodies from clinical association o pathologic mechanism. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 4, 192-199.
54. Giannakopoulos B, Passam F, Rahgozar S, Krilis S.A. (2007) Current concepts on the pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *Blood* 109, 422-430.
55. Fischetti F, Durigutto P, Pellis V, Debeus A, Macor P, Bulla R, Bossi F, Ziller F, Sblattero D, Meroni P, Tedesco, F. (2005) Thrombus formation induced by antibodies to $\beta 2$ glycoprotein 1 is complement - dependent and requires a priming factor. *Blood* 106, 2340-2346.
56. Negrini S, Pappalardo F, Murdaca G, Indiveri F, Puppo F. (2017) The antiphospholipid syndrome: from pathophysiology to treatment. *Clin Exp Med.* Aug 17(3):257-267.
57. Khamastha M, Taraborelli M, Sciascia S, Tincani A. (2016) Antiphospholipid syndrome. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* Feb 30(1):133-48.
58. Pierangeli SS, Chen PP, Raschi E, Scurati S, Grossi C, Borghi MO, et al. (2008) Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome: pathogenic mechanisms. *Semin Thromb Hemost* 34(3):236-50.
59. Merashli M, Noureldine MH, Uthman I, et al. (2015) Antiphospholipid syndrome: an update. *Eur J Clin Invest.* Jun 45(6):653-62.

60. Krone, K. A., Allen, K. L. & McCrae, K. R. (2010) Impaired fibrinolysis in the antiphospholipid syndrome. *Curr. Rheumatol. Rep.* 12, 53-57.
61. Meroni PL, Borghi MO, Raschi E, Ventura D, Sarzi Puttini PC, Atzeni, F, Lonati L, Parati G, Tincani A, Mari D, Tedesco F. (2004) Inflammatory response and the endothelium. *Thromb. Res.* 114, 329-334.
62. Hamid C, Norgate K, D’Cruz DP, Khamashta MA, Arno M, Pearson JD, Frampton G, Murphy JJ. (2007) Anti-beta2GPI-antibody-induced endothelial cell gene expression profiling reveals induction of novel pro-inflammatory genes potentially involved in primary antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 66:1000-7.
63. Biggioggero M, Meroni PL. (2010) The geoepidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Autoimmun Rev.* 9(5):299-304.
64. Cervera R, Rodríguez-Pintó I, Espinosa G Joan C. (2016) Thrombotic Manifestations of the Antiphospholipid Syndrome. *Reverter, Antiphospholipid Syndrome in Systemic Autoimmune Diseases*, 2nd edición, 87-102.
65. Cervera R, Piette JC, Font J, Khamashta MA, Shoenfeld Y, Camps MT, et al. (2002) Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis Rheum.* 46(4):1019-27.
66. Wong RC, Favaloro EJ, Adelstein S, et al. (2008) Consensus guidelines on anti-beta 2 glycoprotein I testing and reporting. *Pathology* 40(1):58-63.
67. Wong RC, Gillis D, Adelstein S, et al. (2004) Consensus guidelines on anti-cardiolipin antibody testing and reporting. *Pathology* 36(1):63-68.
68. Favaloro EJ, et al. (2014) Antiphospholipid antibody testing for the antiphospholipid syndrome: a comprehensive practical review including a synopsis of challenges and recent guidelines. *Pathology* Oct;46(6):481-95.
69. Favaloro EJ, Wong RC, Silvestrini R, McEvoy R, Jovanovich S, Roberts-Thomson PA. (2005) Multilaboratory peer assessment quality assurance program-based evaluation of anticardiolipin antibody, and beta2-glycoprotein I antibody testing.([Multicenter Study]) *Semin Thromb Hemost.* Feb 31:73-84.

12. Anexos

Anexo 1

Procedimiento para evaluar linealidad.

La preparación de las disoluciones debe realizarse de acuerdo a la siguiente tabla:

Número de dilución	Proporción en volumen de la muestra 1	Proporción en volumen de la muestra 2
1	Usar sin diluir	0
2	3	1
3	2	2
4	1	3
5	0	Usar sin diluir

Muestra 1. (M1) concentración baja preferentemente cercana a cero.

Muestra 2. (M2) concentración alta.

Procedimiento:

- Obtener las medias de la concentración o de la actividad de acuerdo a la tabla 1.
- Construir una gráfica con la media aritmética de las replicas sobre el eje Y (ordenadas), en función de la concentración (valor conocido o asignado) sobre el eje X.
- Para construir la gráfica emplear los siguientes criterios: Marcar en el eje X, las concentraciones en función de M2 (0%, 25%, 50%, 75% y 100% de M2). Marcar sobre el eje Y, la escala apropiada al intervalo de valores de las medias obtenidas para las diluciones. Graficar las coordenadas de los puntos: (0%, media de la dilución 1), (25%, media de la dilución 2), (50%, media de la dilución 3), (75%, media de la dilución 4), (100%, media de la dilución 5).
- Calcular la ecuación de la recta para los puntos dados, así como el coeficiente de correlación. La gráfica resultante deberá ser lineal, con un coeficiente de correlación de por lo menos del 0,99.

Número de dilución	Resultados de la concentración o de la actividad			Media
	1	2	3	
1				
2				
3				
4				
5				

Anexo 2

Procedimiento para verificar precisión.

Verificación del valor de repetibilidad

Calcular los grados de libertad de la repetibilidad (v). Para un ensayo con D días de duración, y n replicados por corrida, $v = D \cdot (n-1)$. Para un protocolo de 5 días y 3 replicados por días se recomienda:

$$v=10$$

Determinar el porcentaje C ($1-\alpha/l$) de la distribución X^2 (“chi cuadrada”) con v grados de libertad. Donde α es la tasa de falso rechazo (5% usualmente) y l es el número de niveles ensayados. Los porcentajes de C para 2,3, y 4 niveles son 97.5%, 98.33% y 98.75% respectivamente. Otros valores pueden ser obtenidos de programas estadísticos. Para el protocolo de 5 días de duración y dos niveles : $C=20.48$. Calcular el valor de verificación mediante la siguiente fórmula:

$$VVSr = \frac{Sr\sqrt{C}}{\sqrt{v}}$$

Si la repetibilidad estimada Sr es menor o igual al valor de verificación, los datos son consistentes con la repetibilidad declarada por el fabricante y el valor queda verificado. Si no fue posible verificar el valor de precisión, se debe contactar para asistencia al fabricante o proveedor.

Verificación de la precisión intra laboratorio o iner corrida

Si la precisión estimada es mayor que la declarada por el fabricante y la precisión en condición de repetibilidad es mayor que la del fabricante, se deben realizar pruebas para determinar si las diferencias no son estadísticamente significativas de la siguiente manera: Calcular los grados de libertad de la precisión intra laboratorio t para un experimento de D días y n replicados por corrida.

$$T = \frac{\left((n-1)S_r^2 + (nS_b^2) \right)^2}{\left(\frac{n-1}{D} \right) S_r^4 + \left(\frac{n^2(S_b^2)^2}{D-1} \right)}$$

Determinar el porcentaje C ($1-\alpha/l$) de la distribución X^2 (“chi cuadrada”) con v grados de libertad. Donde α es la tasa de falso rechazo (5% usualmente) y l es el numero de niveles ensayados. Los porcentajes de C para 2,3, y 4 niveles son 97.5%, 98.33% y 98.75%. Otros valores pueden ser obtenidos de programas estadísticos. Calcular el valor de verificación (VV.) de la siguiente manera:

$$VVSl = \frac{Sl}{T} * \sqrt{C}$$

Si la repetibilidad estimada Sl es menor o igual al valor de verificación, los datos son consistentes con la repetibilidad declarada por el fabricante y el valor queda verificado. Si no fue posible verificar el valor de precisión, se debe contactar para asistencia al fabricante o proveedor.

Anexo 3

Procedimiento para evaluar veracidad mediante materiales de referencia.

Seleccionar el material mas apropiado para el procedimiento. Analizar por lo menos dos niveles de concentración, aunque pueden ser evaluados más niveles. Los niveles deben ser los niveles altos y bajos del procedimiento de medida, es importante incluir el nivel de decisión médica. El procedimiento se realiza de la siguiente forma:

1. Preparar las muestras de acuerdo al procedimiento del fabricante.
2. Analizar cada material de control en 3 a 5 corridas, cada muestra se analiza por duplicado.
3. Calcular la media y la desviación estándar para cada nivel.

Validación la veracidad:

- Asumir una tasa de rechazo α . Usualmente 1% y 5% .
- Asumir que el fabricante no ha declarado bias para el valor asignado.
- Determinar el porcentaje t (100- α) de la distribución t con 2n-1 grados de libertad. Donde n representa el numero de muestras analizadas y 2 el numero de replicados
- Calcular el intervalo de verificación para bias en unidades reportables como:

$$\bar{x} \pm t_{1-\alpha, 2n-1} * \sqrt{S_x^2 + S_a^2}$$

Si el porcentaje de bias obtenido es muy diferente que la del valor asignado, pero aún se encuentra dentro del intervalo de verificación, probablemente se requiera un ensayo con un mayor número de muestras. Si el valor asignado no se encuentra dentro del intervalo de verificación, el usuario no ha demostrado veracidad. El laboratorio debe considerar alguna de estas dos opciones:

- 1) Determinar si la diferencia de bias y el error total son aceptables para las necesidades médicas de la prueba y 2) contactar al proveedor para asistencia.