

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS  
“DR. SERAFÍN RUIZ DE ZÁRATE RUIZ”  
SANTA CLARA, VILLA CLARA

## ARTÍCULO ORIGINAL

### LAS CURVAS CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO EN LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS QUÍMICOS CUALITATIVOS CON DETECCIÓN SENSORIAL

Por:

MSc. Mildrey Vales Almodóvar<sup>1</sup>, Dr. C. Luis R. Bravo Sánchez<sup>2</sup> y MSc. Luis Zamora Rodríguez<sup>3</sup>

1. Máster en Química Analítica. Unidad de Investigaciones Biomédicas. Universidad de Ciencias Médicas “Dr. Serafín Ruiz de Zárate Ruiz”. Santa Clara. Villa Clara. Asistente. UCM-VC. e-mail: [mildreyva@ucm.vcl.sld.cu](mailto:mildreyva@ucm.vcl.sld.cu)
2. Doctor en Ciencias Químicas. Facultad de Química-Farmacia. UCLV. Profesor Titular. e-mail: [lbravo@uclv.edu.cu](mailto:lbravo@uclv.edu.cu)
3. Máster en Matemática Aplicada. Facultad de Medicina. Universidad de Ciencias Médicas “Dr. Serafín Ruiz de Zárate Ruiz”. Santa Clara, Villa Clara. Asistente. UCM-VC. e-mail: [luiszr@ucm.vcl.sld.cu](mailto:luiszr@ucm.vcl.sld.cu)

### *Resumen*

**Introducción:** En los laboratorios donde se procesan grandes volúmenes de muestras, es habitual determinar si uno o más analitos están presentes o ausentes en la muestra analizada, mediante el empleo de los métodos cualitativos como técnicas de selección. La calidad de estos resultados es de gran importancia, al evaluarse los parámetros de rendimiento en estas técnicas antes de introducirlas como métodos de pesquiasaje. **Objetivo:** Desarrollar un procedimiento mediante pruebas estadísticas que permitan evaluar los parámetros de calidad en un método cualitativo con un sistema de detección sensorial. **Métodos:** El diseño experimental estuvo basado en la construcción de curvas características de funcionamiento para evaluar parámetros de calidad, como: índices de sensibilidad y especificidad, región de incertidumbre, límite de corte y proporción de respuestas falsas, según el sistema de detección del método analítico a validar. **Resultados:** El valor resultante de la proporción de falsos positivos muestra que el método tiende a proporcionar un resultado positivo cuando es negativo en aquellas muestras donde el porcentaje de actividad de la biotinidasa está entre el 10 y el 25 %, valores correspondientes a los límites de la región de incertidumbre. **Conclusiones:** Los parámetros evaluados resaltan que el método validado es adecuado para el propósito definido y demuestra que las curvas características de funcionamiento son una metodología muy útil para realizar la validación de métodos cualitativos con detección sensorial.

*Descriptor deCS:*  
ANÁLISIS CUALITATIVO  
ESTUDIOS DE VALIDACION

*Subject headings:*  
QUALITATIVE ANALYSIS  
VALIDATION STUDIES

## **Introducción**

La validación es un proceso que debe realizarse cada vez que un nuevo método de análisis va a ser usado en un laboratorio o en el campo de análisis a estudiar.

La idea de método cualitativo no es, en modo alguno, nueva. De hecho, ha sido definido por la Comunidad Europea como "la evaluación de la presencia o ausencia de uno o más analitos en una muestra, debido a sus propiedades físicas y químicas"<sup>1-3</sup>. Teniendo en cuenta el creciente interés en los métodos cualitativos de análisis, los conceptos de los parámetros de desempeño han sido resumidos en un documento publicado en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas<sup>4,5</sup>.

Como puede deducirse fácilmente, la presencia o ausencia no se considera una medida absoluta relacionada con un nivel de concentración de cero, sino con un determinado nivel de concentración. Por debajo de este nivel, la concentración de la sustancia analizada se considera no significativa. La detección de esta sustancia puede requerir de un instrumento o de los sentidos humanos, pero cualquiera que sea la forma en que la respuesta se registra, se convierte en un resultado binario del tipo Sí/No<sup>6-8</sup>.

Desde el punto de vista práctico, el principal interés en el desarrollo de estos sistemas radica en que se utilizan como una etapa previa de cribado de las muestras; de esta manera, se evita que estas sean sometidas a todo el proceso químico de medida. Únicamente seguirán el proceso de análisis cuantitativo las muestras cuya respuesta sea un 'Sí' (positivo) y aquellas en las que se detecte la presencia o ausencia de un analito, o las que estén por encima o por debajo del nivel permitido<sup>9-11</sup>.

Si se atiende al tipo de sistema utilizado para la obtención de la respuesta, se pueden diferenciar dos grandes grupos: el análisis cualitativo clásico o sensorial y el análisis cualitativo instrumental, ambos ampliamente utilizados en el campo de la Química Clínica.

En el análisis cualitativo clásico, la detección es de tipo sensorial y su principal característica es que los sentidos humanos se utilizan para registrar e interpretar la respuesta<sup>12-14</sup>.

Durante la última década, los métodos cualitativos han sido ampliamente desarrollados y, como consecuencia, algunos de ellos son ahora empleados como métodos de cribado. Sin embargo, la gama de aplicaciones no es tan amplia como en el análisis cuantitativo. Una de sus aplicaciones más recientes se puede encontrar, principalmente, en pesquisajes neonatales y selectivos de alteraciones metabólicas, como el diagnóstico de deficiencia de biotinidasa.

## **Métodos**

Para llevar a cabo la validación de un método cualitativo de tipo sensorial, deben construirse las curvas características del método. En nuestro caso, se valida un método para la detección de la actividad de biotinidasa, enzima responsable de liberar la biotina en el organismo y para realizar pesquisajes neonatales que permitan diagnosticar el trastorno metabólico producido por deficiencia enzimática<sup>15, 16</sup>.

En este estudio, las muestras que desarrollan un color púrpura son consideradas como muestras donde está presente la actividad enzimática, y pertenecen a individuos sanos; las muestras que no desarrollen este color son consideradas como carentes de actividad enzimática y corresponden a individuos enfermos. Son consideradas como muestras dudosas o no concluyentes aquellas donde no es posible definir su color. El proceso de validación se realiza mediante diez controles patológicos, donde se confirma con anterioridad la carencia de actividad enzimática.

Cada experimento es representado por diferentes variables: analista, días, muestras y réplicas (i, j, k, l). El proceso experimental a seguir se muestra en la figura 1.

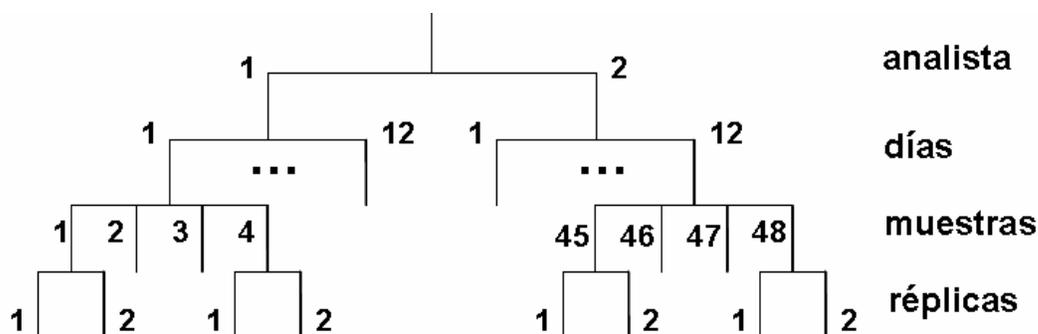


Fig 1 Proceso experimental a seguir para la validación mediante el método de las curvas características donde: analista  $i = 1$  y  $2$ ; días  $j = 1 \dots 12$ ; muestras =  $1 \dots 48$ ; réplicas =  $1$  y  $2$ .

Cada uno de los analistas prepara y analiza cuatro muestras independientes en un período de 12 días, en condiciones de repetibilidad. En total se analizan 184 muestras.

Las muestras se analizaron en un rango de concentración de 0,01 a 0,20 mmol/l de ácido p-aminobenzoico (0,33-6,66 de actividad enzimática expresada en nmol de ácido p-aminobenzoicoliberado /min /ml de suero).

Para construir las curvas características de funcionamiento, se contamina un conjunto de muestras carentes de actividad enzimática con diferentes concentraciones dentro del intervalo seleccionado previamente. El nivel de concentración más alto debe proporcionar resultados donde se demuestre la presencia enzimática; de igual forma, el nivel más bajo debe proporcionar resultados donde se demuestre la carencia de actividad, es decir, muestras positivas.

Para cada nivel de concentración, se calcula el número de resultados positivos (carencia de actividad enzimática) y su porcentaje. De igual manera, se procede con los resultados negativos  $N(X)$  y con los no concluyentes  $I(X)$ , y en gráficos, se muestra el porcentaje de los resultados positivos y se comparan con los distintos niveles de concentración, y como resultado no concluyente se obtiene  $P(X) + I(X)$  donde la curva es similar a  $P(X)$ .

Como resultado del método de análisis cualitativo, se alcanza una respuesta negativa relacionada con la presencia de actividad enzimática (individuos sanos), o positiva cuando no existe actividad de biotinidasa (individuos enfermos).

Los parámetros a definir son la proporción de falsos positivos y negativos, los índices de sensibilidad y especificidad, la incertidumbre, el valor de corte y el límite de detección.

## Resultados

Para evaluar los parámetros de calidad o de desempeño, las probabilidades de cometer errores falsos positivos ( $\alpha$ ) y falsos negativos ( $\beta$ ) fueron fijados al 5 %, y se corresponden con las líneas horizontales mostradas en la figura 2:  $\alpha = 5 \%$  y  $100 - \beta = 95 \%$ .

El primer parámetro determinado es la región de incertidumbre, definido por el límite superior e inferior (Fig 2). El límite superior corresponde con el nivel de actividad enzimático donde la curva  $P(X)$  se intercepta con la probabilidad de error  $100 - \beta$ . Como el límite de corte y el límite de detección coinciden con el límite superior de la región de incertidumbre, este será 0,6 nmol/min/ml ( $\approx 10 \%$  de actividad enzimática).

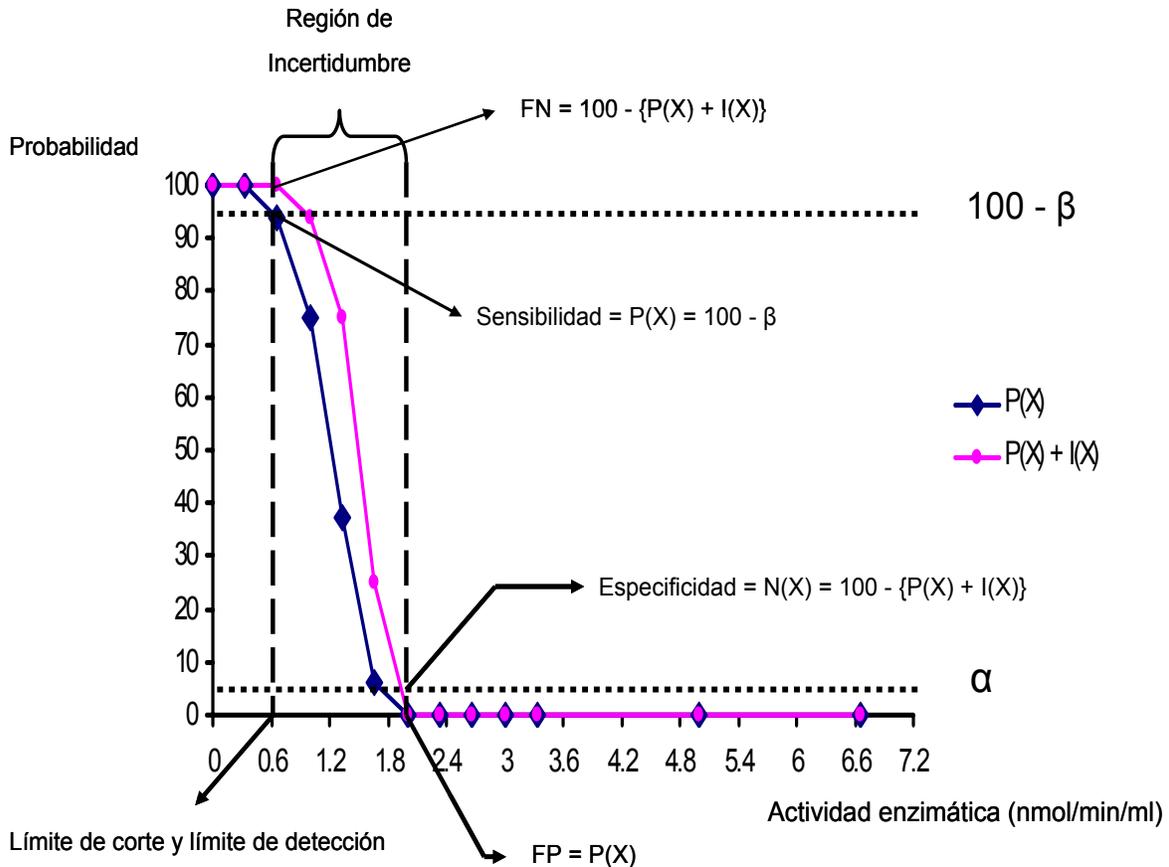


Fig 2 Curvas características obtenidas a partir de los resultados experimentales.

El límite inferior, siguiendo el mismo procedimiento, coincidió con el nivel de actividad donde la línea horizontal ( $\alpha$ ) intercepta la función  $P(X) + I(X)$ , 2,00 nmol/min/ml ( $\approx 25\%$  de actividad enzimática). Por lo tanto, la región de incertidumbre estuvo entre los niveles de 0,66 y 2 nmol/min/ml, y el porcentaje de actividad entre el 10 y el 25 %.

En el caso de la proporción de sensibilidad, para un 10 % de actividad enzimática (0,66 nmol/min/ml) es de un 95 %, como corresponde al punto:

$$P(X) = 100 - \beta$$

La proporción de falsos negativos también debe ser evaluada; este porcentaje de actividad en nuestro caso es igual a 0, como resultado de las siguientes ecuaciones:

$$FN = 100 - \{P(X) + I(X)\} \quad FN = 100 - 100 = 0$$

El índice de especificidad al 25 % de actividad enzimática corresponde con el punto:

$$N(X) = 100 - \{P(X) + I(X)\} = 95\%$$

La proporción de falsos positivos es cero:

$$FP = P(X) = 0$$

## **Discusión**

El valor resultante de la proporción de falsos positivos muestra que el método tiende a proporcionar un resultado positivo cuando realmente es negativo en aquellas muestras donde el porcentaje de actividad de la biotinidasa está entre el 10 y el 25 %, valores que corresponden con los límites de la región de incertidumbre, donde solo los falsos positivos pueden ocurrir, y se corresponden con las muestras que tienen como resultado final una deficiencia parcial de biotinidasa.

Si se tiene en cuenta que algunos aspectos aún están por desarrollarse y aclararse, la validación de métodos químicos de análisis cualitativo es una cuestión importante a considerar, con el objetivo de ofrecer confianza a los analistas. A pesar de que varias organizaciones trabajan en esta tarea, muy pocos han definido los protocolos de validación. Las curvas características de funcionamiento es un procedimiento que, a pesar de la elevada carga experimental que se debe realizar a los distintos niveles de concentración, permite evaluar, además de los cuatro parámetros básicos (falsos positivos, falsos negativos, sensibilidad y especificidad), el límite de detección y la región de incertidumbre, y es adecuado para validar los métodos químicos cualitativos que presentan como característica un sistema de detección sensorial.

## **Summary**

**Introduction:** In laboratories, where large volumes of samples are processed, is common to determine if one or more analytes are present or absent in the analyzed sample, by means of the use of qualitative methods as selection techniques. The quality of these results is of great importance when evaluating performance parameters in these techniques before introducing them as investigation methods. **Objective:** To develop a procedure through statistical tests that allows evaluation of quality parameters in a qualitative method with a sensorial detection system. **Method:** Experimental design was based in the construction of performance characteristic curves in order to evaluate quality parameters, such as: sensibility and specificity indexes, uncertain region, cutoff limit, and proportion of false answers, according to the detection system of analytic method to validate. **Results:** The resulting value of proportion of positive falses shows that this method tends to propose a positive result when is negative in those samples in which biotinidasa activity percentage values are between 10 to 25 %, correspondent values to the uncertain region limits. **Conclusions:** Evaluated parameters stand out that the validated method is adequate for the defined purpose and demonstrates that performance characteristic curves are an useful methodology for validating qualitative methods with sensorial detection.

## **Referencias bibliográficas**

1. Ríos A, Barceló D, Buydens L, Cárdenas S. Quality assurance of qualitative analysis in the framework of the European project 'MEQUALAN'. Accreditation Quality Assurance. 2003;8(2):68-77.
2. Commission Regulation (EC) No 257/2002 of 12 February 2002 amending Regulation (EC) No 194/97 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs and Regulation (EC) No 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official J Eur Union. 2002;45(2):12-5.
3. Trullols E, Ruisánchez I, Rius FX. Establecimiento de los parámetros de calidad de test kits de respuesta visual. Grupo de Quimiometría y Cualimetría [Internet]. Tarragona: Universitat Rovira y Virgili; 2003 [citado el 3 de febrero de 2011]. Disponible en: [http://www.quimica.urv.es/quimio/general/parametros\\_calidad\\_test\\_kits\\_visual.pdf](http://www.quimica.urv.es/quimio/general/parametros_calidad_test_kits_visual.pdf)
4. Forsum U, Hallander HO, Kallner A, Karlsson D. The impact of qualitative analysis in laboratory medicine. Trends Analytical Chemistry. 2005;24(6):546-55.
5. Feleeeersine P, Abeyta C, Andrews W. AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis. J AOAC Int. 2002;85(5):1187-1200.

6. Moran Villatoro L. Obtención de muestras sanguíneas calidad analítica, mejoría continua de la etapa preanalítica. La Habana: Ciencias Médicas; 2006. p. 35-88.
7. Ríos A., Téllez H. Reliability of binary analytical responses. Trends Analytical Chemistry. 2005;24(6):509-15.
8. Simonet BM, Quality control in qualitative analysis. Trends Analytical Chemistry. 2005;24(6):525-31.
9. Duffau B, Rojas F, Guerrero I, Roa L, Rodríguez L, Soto M, *et al.* Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición. Aspectos generales sobre la validación de métodos. Santiago de Chile: Departamento de salud ambiental. Instituto de Salud Pública; 2010. [citado el 4 de febrero de 2011]. Disponible en: [http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento\\_tecnico/2010/12/Guia%20T%C3%A9cnica%201%20validaci%C3%B3n%20de%20M%C3%A9todos%20y%20determinaci%C3%B3n%20de%20la%20incertidumbre%20de%20la%20medici%C3%B3n\\_1.pdf](http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia%20T%C3%A9cnica%201%20validaci%C3%B3n%20de%20M%C3%A9todos%20y%20determinaci%C3%B3n%20de%20la%20incertidumbre%20de%20la%20medici%C3%B3n_1.pdf)
10. Valcárcel M, Cárdenas S. Modern qualitative analysis. Trends Analytical Chemistry. 2005;24(6):467.
11. Trullols Soler E. Validation of Qualitative Analytical Methods [Tesis]. Tarragona: Universitat Rovira Virgilia; 2006 [citado el 4 de febrero de 2011]. Disponible en: [http://www.tdr.cesca.es/TESIS\\_URV/AVAILABLE/TDX-0525106-095917//EstherTrullols.pdf](http://www.tdr.cesca.es/TESIS_URV/AVAILABLE/TDX-0525106-095917//EstherTrullols.pdf)
12. Trullols Soler E, Ruisánchez Capelastegui I, Xavier Rius F. Qualitative method for determination of aflatoxin b1 in nuts. J AOAC Int. 2004;87(2):417-23.
13. San Vicente de la Riva B, Costa-Fernández JM, Pereiro R, Sanz-Medel A. Spectrafluorimetric method for the rapid screening of toxic heavy metals in water samples. Analytica Chemistry Acta. 2002;451(2):203-10.
14. Xavier Rius F, Trullols Soler E, Ruisánchez Capelastegui I. Validación de métodos analíticos cualitativos. Técnicas de laboratorio. 2003;281:328-35.
15. Trullols E, Ruisánchez I, Rius FX. Validation of qualitative methods of analysis that use control samples. Trends Analytical Chemistry. 2005;24(6):516-24.
16. González Reyes E, Marrero González N. Deficiencia de Biotinidasa. Bioquímica. 2002;27(3):80-6.
17. Pulido A, Ruisánchez Capelastegui I, Boqué R, Xavier Rius F. Estimating the uncertainty of binary test results to assess their compliance with regulatory limits. Analytica Chemistry Acta. 2002;455:267-75.

Recibido: 12 de noviembre de 2010

Aprobado: 14 de diciembre de 2010