



Universidad
Zaragoza



**Hospital
Clínico
Universitario
Lozano Blesa**

Trabajo Fin de Grado

Evaluación del ensayo Elecsys Hormona Antimülleriana y
comparación de dos métodos diferentes en una serie clínica

Autora:

Lotus Engel

Directoras:

Marta Fabre Estremera

Emma Lara Navarro

Ponente:

Nuria Garrido Pérez

Facultad de Ciencias Universidad de Zaragoza

Curso 2023/2024

Resumen

La hormona antimülleriana es un marcador clínico esencial para evaluar la reserva ovárica. Los valores séricos de hormona antimülleriana permiten estimar la respuesta a técnicas de reproducción asistida como la fecundación in vitro y se correlacionan con el recuento de folículos antrales. El recuento de folículos antrales se realiza mediante ecografía transvaginal, pero en ausencia de ecógrafos y personal cualificado, la medición de hormona antimülleriana se usa como alternativa debido a su alta correlación.

El objetivo de este estudio es verificar las prestaciones analíticas del método de determinación de Hormona Antimülleriana mediante inmunoensayo de electroquimioluminiscencia de Roche Diagnostics y estudiar la intercambiabilidad de los resultados de la determinación de hormona antimülleriana mediante los métodos de los equipos de medición del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa: Access[®] 2 de Beckman Coulter y Cobas[®] Pure de Roche Diagnostics. Además, se evaluará la capacidad pronóstica de la hormona antimülleriana para predecir el recuento de foliculos antrales.

La verificación del método se realizó estudiando la precisión, la reproducibilidad, la linealidad, el límite de detección y el límite de decisión clínica. Para la comparación de métodos se realizaron un estudio de las diferencias mediante Bland-Altman y un análisis de regresión lineal Passing-Bablok. También se estudió la capacidad diagnóstica mediante una tabla de contingencia.

Los resultados demuestran que el método de determinación de Hormona Antimülleriana de Roche Diagnostics es preciso y reproducible en las condiciones de trabajo y que presenta una buena asociación lineal en todo el rango de concentraciones. Además, la determinación de Hormona Antimülleriana tiene un elevado valor predictivo positivo. Por su parte, los resultados proporcionados por las metodologías de Beckman Coulter y Roche Diagnostics para la determinación de dicha hormona resultaron no ser comparables.

Abstract

Measurement of the serum Anti-Müllerian Hormone level allows a quantitative evaluation of the ovarian reserve. Anti-Müllerian Hormone measurement represents a reliable marker of ovarian response to assisted reproductive technology such as in vitro fertilization and is strongly correlated with antral follicle count. The antral follicle count is performed via transvaginal ultrasound, but in the absence of ultrasound machines and qualified operators, Anti-Müllerian hormone measurement is used as an alternative due to its high correlation.

The aim of this study is to verify the analytical performance of the Anti-Müllerian Hormone determination method by Roche Diagnostics that involves an electrochemiluminescence immunoassay and to study the interchangeability of Anti-Müllerian Hormone measurements using the clinical devices available at the Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa: Beckman Coulter Access® 2 and Roche Diagnostics Cobas® Pure. On the other hand, the predictive capacity of Anti-Müllerian hormone to predict the antral follicle count will be evaluated.

Method validation was performed by studying precision, reproducibility, linearity, the detection limit and the clinical decision limit. For method comparison, a Bland-Altman difference study and a Passing-Bablok linear regression analysis were performed. And the diagnostic capability was studied by means of a contingency table.

The results prove that the Roche Diagnostics Anti-Müllerian Hormone determination method is accurate and reproducible under working conditions and that it shows a good linear association over the entire concentration range. In addition, the determination of Anti-Müllerian Hormone has a high positive predictive value. On the other hand, the results provided by the Beckman Coulter and Roche Diagnostics methodologies for the determination of this hormone were not interchangeable.

Índice

Resumen	2
Abstract	3
1. Introducción	5
1.1. La hormona antimülleriana	5
1.2. Verificación de método	6
1.3. Comparación de métodos	6
1.4. Capacidad predictiva de una prueba diagnóstica	8
2. Objetivos y planteamiento	9
2.1 Objetivos	9
2.2 Planteamiento	9
3. Parte experimental	10
3.1. Material	10
3.2. Métodos	10
3.2.1. Principio del test	10
3.2.2. Calibración y control	11
3.2.3. Verificación de método	12
3.2.4. Comparación de métodos	12
3.2.5. Estudio de correlación entre valor de HAM y RFA	13
4. Resultados y discusión	14
4.1. Verificación de método	14
4.2. Comparación de métodos	17
4.2.1 Comparación de métodos en el límite de decisión clínica	19
4.3. Estudio de correlación	20
5. Conclusiones	22
6. Bibliografía	23

1. Introducción

1.1. La hormona antimülleriana

La hormona antimülleriana (HAM) es una glicoproteína homodimérica constituida por dos subunidades idénticas unidas mediante puentes disulfuro (**Figura 1**). Pertenece a la familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y desempeña un papel crucial en la diferenciación sexual. Durante el periodo fetal, la HAM es secretada principalmente por las células de Sertoli, provocando la regresión de los conductos de Müller en embriones masculinos⁽¹⁾.

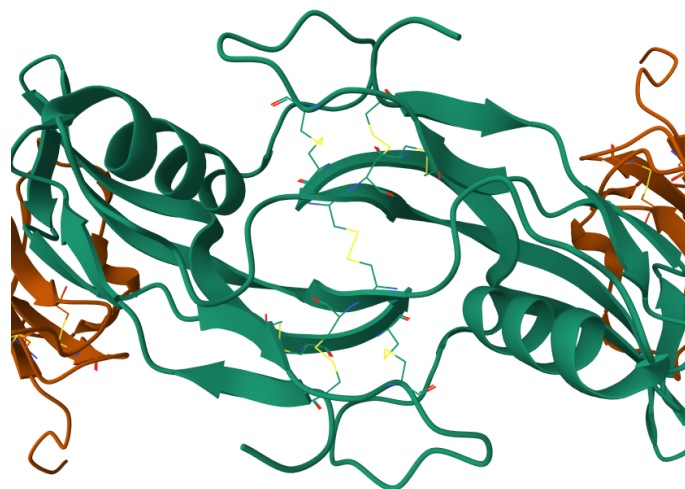


Figura 1. Estructura de la hormona antimülleriana. Unión de dos subunidades idénticas mediante puentes disulfuro⁽²⁾.

En la actualidad, la HAM se ha convertido en un marcador clínico de gran utilidad para evaluar la reserva ovárica. En mujeres, la HAM es principalmente secretada por las células de la granulosa de folículos preantrales y folículos antrales pequeños de tamaño igual o inferior a 4 mm⁽³⁾. La producción de HAM al nacer es prácticamente nula y alcanza su pico máximo tras la pubertad. Con la edad, junto al declive de folículos preantrales y primarios, la producción de HAM disminuye hasta llegar a niveles indetectables tras la menopausia.

Además, los valores séricos de la HAM pueden correlacionarse con la cantidad de folículos antrales, cuyo recuento (RFA) se realiza por ecografía transvaginal^(1,4). Este método es más costoso, requiere de un ecógrafo y, además, de personal cualificado, por lo que a menudo se determinan los niveles de HAM debido a su alta correlación.

La evaluación de la reserva ovárica permite estimar la respuesta a técnicas de reproducción asistida (TRA) como la fecundación in vitro (FIV). Se ha visto que en mujeres con una reserva ovárica extremadamente reducida son frecuentes la cancelación del ciclo o una respuesta deficiente al tratamiento. Esto permite establecer el límite de decisión clínica como valor de corte por debajo del cual la paciente no opta a TRA a través de la sanidad pública, reduciendo costes sanitarios y daños personales⁽⁵⁾. En Aragón cada hospital dispone de su propia unidad de

infertilidad que valora las diferentes opciones reproductivas de las parejas con deseo gestacional. Sin embargo, la realización del proceso de FIV está centralizada en el Hospital Universitario Miguel Servet. Esto provoca que, a menudo, se produzcan duplicidades de pruebas y, en el caso de la HAM, resultados discordantes, ya que el límite de decisión clínica (0,6 ng/mL) ha sido establecido sin tener en cuenta si los diferentes métodos analíticos implantados en los Servicios de Bioquímica Clínica de los hospitales de Aragón son intercambiables.

1.2. Verificación de método

Antes de integrar una nueva técnica en un laboratorio, es necesario evaluar y comprobar que los métodos y procedimientos analíticos elegidos proporcionen resultados adecuados. Este proceso de verificación de método consiste en comprobar que las prestaciones analíticas especificadas por el fabricante en un procedimiento normalizado cumplen los requisitos metrológicos establecidos por el laboratorio. De esta forma, se garantiza que las nuevas técnicas proporcionan resultados fiables antes de su implementación rutinaria^(6,7). Para ello, existe un protocolo establecido por la Sociedad Española de Medicina de Laboratorio (SEQC) para la verificación de las prestaciones de precisión declaradas por el fabricante donde se detallan los estudios que son necesarios realizar:

Estudio de la precisión o repetibilidad. La precisión refleja la concordancia entre los resultados obtenidos en mediciones repetidas de un mismo mensurando bajo unas condiciones determinadas⁽⁸⁾.

Estudio de la reproducibilidad. La veracidad de un procedimiento de medida se estudia mediante la estimación del error sistemático, que es la diferencia entre la media de resultados de medida obtenidos y un valor convencionalmente verdadero como, por ejemplo, una muestra control^(7,9).

Estudio de la linealidad. La linealidad es una propiedad importante para los métodos de laboratorio clínico y analítico. Se estudia la linealidad en el rango de trabajo del método para verificar su capacidad de proporcionar resultados directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra⁽¹⁰⁾.

Verificación del límite de detección. El límite de detección representa el valor mínimo de analito detectable por el método⁽¹¹⁾.

Comprobación del límite de decisión clínica. El límite de decisión clínica es un valor de corte que se establece para determinar un diagnóstico médico⁽¹²⁾.

1.3. Comparación de métodos

Ante la instalación de un nuevo equipo de medida en el laboratorio se debe realizar una verificación de la intercambiabilidad de resultados respecto al equipo en uso⁽¹³⁾. Debemos asegurar que el grado de concordancia entre los resultados obtenidos sea independiente de los sistemas o plataformas analíticas y que, por tanto, las mediciones sean comparables⁽¹⁴⁾. Si los resultados proporcionados por los distintos analizadores no superan la desviación máxima establecida, estos serán intercambiables⁽¹³⁾.

El análisis de los resultados se realiza mediante dos metodologías:

Un análisis de las diferencias entre las mediciones de los equipos a comparar determina la posible presencia de un sesgo, ya sea constante o proporcional. Para ello se utiliza un diagrama de diferencias o diagrama de Bland-Altman. La interpretación de los resultados se realiza comparando la media de las diferencias, en forma absoluta y relativa, frente a la desviación máxima admisible, que se establece mediante el criterio biológico o, en su ausencia, mediante criterio estadístico^(14,15). Para la interpretación de resultados haciendo uso del criterio estadístico, se trabaja con los intervalos de confianza del 95% de la media de las diferencias. Si el intervalo de confianza del 95 % de la media incluye el valor cero, se puede afirmar que no existen diferencias significativas entre los resultados de los procedimientos de medida y los resultados son intercambiables. Sin embargo, si el intervalo de confianza del 95 % de la media de las diferencias absolutas no incluye el valor cero, las diferencias son significativas de tipo sistemático constante y si el intervalo de confianza del 95 % de la media de las diferencias relativas porcentuales no incluye el cero, las diferencias son significativas de tipo sistemático proporcional y los resultados de ambos equipos no son intercambiables⁽¹³⁾.

Con un análisis de regresión lineal se obtiene la línea de tendencia que mejor se ajusta a los datos y que permite predecir una variable en función de la otra⁽¹⁵⁾. Previamente, es necesario estudiar la linealidad de los datos. Se calcula el coeficiente de correlación de Pearson (r) para saber si es posible realizar la regresión lineal. Un $r = 1$ indica una correlación perfecta entre los equipos. De esta forma, si $r < 0.975$, el tamaño muestral no es lo suficientemente amplio y deben incluirse más muestras. Si tras realizar la ampliación el valor del coeficiente no alcanza el nivel requerido, se considera que los resultados no son intercambiables. Si $r \geq 0.975$, se puede llevar a cabo el análisis de regresión lineal^(13,14). Para la regresión lineal se representan gráficamente los resultados de los dos equipos de medición en un eje de coordenadas, donde se relacionan mediante la ecuación de una recta ($y=mx+b$). Existen numerosos métodos de regresión lineal, entre los que destaca el de Passing-Bablok por ser el más consistente desde un punto de vista estadístico. Passing-Bablok es una técnica estadística no paramétrica que calcula la pendiente de la línea de regresión como la mediana de todas las pendientes posibles entre pares de puntos de datos, lo que la hace robusta frente a valores atípicos⁽¹⁵⁾. Para interpretar los resultados hay que tener en cuenta los intervalos de confianza del 95% de la pendiente y de la ordenada en el origen de la recta obtenida. Si los intervalos de confianza contienen el valor 0 para la ordenada en el origen y el valor 1 para la pendiente, se considera que no existen diferencias estadísticamente significativas, por lo que los resultados proporcionados por ambos equipos son intercambiables. Sin embargo, cuando el intervalo de confianza para la pendiente no contiene el valor 1, existirá un error sistemático proporcional y cuando el intervalo de confianza para la ordenada en el origen no contiene el valor 0, un error sistemático constante⁽¹³⁾.

Para que los resultados de ambos métodos sean comparables, tanto el análisis de diferencias como la regresión lineal deben concluir que los resultados de las mediciones de los equipos evaluados son intercambiables. Si el resultado de una de las dos metodologías no cumple, la conclusión es que no son comparables.

1.4. Capacidad predictiva de una prueba diagnóstica

La evaluación de una prueba diagnóstica se realiza estimando la magnitud de errores y aciertos que se cometen al dar un diagnóstico a partir de los resultados proporcionados por la prueba. Los términos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo son indicadores estadísticos que evalúan la eficacia inherente a una prueba diagnóstica⁽¹⁶⁾.

La sensibilidad de la prueba se define como la proporción de individuos enfermos que poseen una prueba positiva (**Ecuación 1**). La especificidad se define como la proporción de individuos sanos que poseen una prueba negativa (**Ecuación 2**). El valor predictivo positivo (VPP) refleja la proporción de individuos con una prueba diagnóstica positiva que presentan la enfermedad (**Ecuación 3**). Y el valor predictivo negativo (VPN) indica la proporción de individuos con una prueba diagnóstica negativa que no presentan la enfermedad (**Ecuación 4**)⁽¹⁷⁾.

$$\text{Sensibilidad} = \text{VP}/(\text{VP} + \text{FN}) \qquad \text{Ecuación 1.}$$

$$\text{Especificidad} = \text{VN}/(\text{VN} + \text{FP}) \qquad \text{Ecuación 2.}$$

$$\text{VPP} = \text{VP}/(\text{VP} + \text{FP}) \qquad \text{Ecuación 3.}$$

$$\text{VPN} = \text{VN}/(\text{VN} + \text{FN}) \qquad \text{Ecuación 4.}$$

Donde VP son los verdaderos positivos; FP, los falsos positivos; VN, los verdaderos negativos; y FN, los falsos negativos.

2. Objetivos y planteamiento

2.1 Objetivos

- Llevar a cabo una verificación del método de Roche Diagnostics para la determinación de Hormona Antimülleriana, incluyendo un análisis de la repetitividad, la reproducibilidad, la linealidad, el límite de decisión clínica y el límite de detección.
- Evaluar la intercambiabilidad de resultados entre dos equipos de medición de la Hormona Antimülleriana en el HCU Lozano Blesa: Access[®] 2 Beckman Coulter y Cobas[®] Pure Roche Diagnostics.
- Realizar un análisis de la capacidad predictiva de la Hormona Antimülleriana para el recuento de folículos antrales.

2.2 Planteamiento

Estudio retrospectivo entre agosto del 2023 y enero de 2024 de las muestras séricas con solicitud de Hormona Antimülleriana al Servicio de Bioquímica Clínica del HCU Lozano Blesa. El estudio se ha realizado con la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón (CEICA) y de la Dirección del HCU Lozano Blesa (ver anexos).

Los criterios de inclusión para la selección de las muestras fueron:

- Disponibilidad de muestra en el laboratorio clínico.
- Concentración conocida de Hormona Antimülleriana con el equipo Beckman Coulter.
- Datos del recuento de folículos antrales asociado a una muestra sérica.

3. Parte experimental

3.1. Material

- Equipo Cobas[®] Pure de Roche Diagnostics.
- Kit de calibración AMH CalSet (Lote: 714829).
- Kit de control PreciControl AMH para dos niveles (Nivel 1, Lote: 703395. Nivel 2, Lote 703398).
- Diluyente universal.
- Agua destilada.
- Pipeta volumen variable calibrada mediante protocolo EQ-Z3€C_L-BQ-392.
- Guantes de nitrilo.
- Programa Microsoft[®] Excel.
- Sistema informático del laboratorio Modulab.
- Historia Clínica Electrónica.

3.2. Métodos

3.2.1. Principio del test

La técnica de determinación es un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) tipo sandwich y tiene una duración total de 18 minutos.

El inmunoensayo tipo sandwich es un un tipo de inmunoanálisis no competitivo (**Figura 2**)⁽¹⁸⁾. La señal obtenida es proporcional a la concentración de HAM⁽¹⁹⁾.

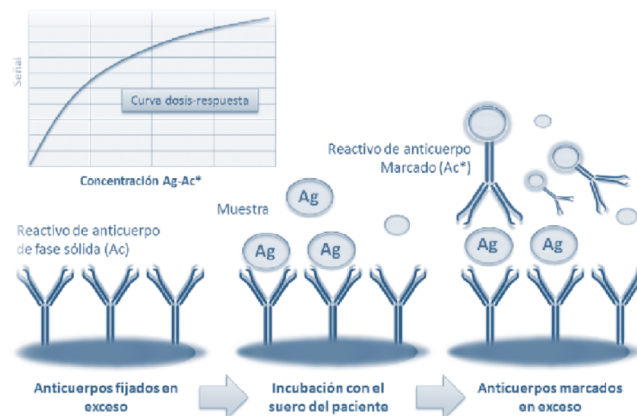


Figura 2. Inmunoensayo tipo sandwich. El analito (antígeno) de la muestra reacciona con dos anticuerpos diferentes que reconocen distintas partes del antígeno. Uno de los anticuerpos generalmente está fijado en el soporte sólido para facilitar la separación de la fracción ligada, y el otro lleva la marca. Se mide por la cantidad del marcador considerado, que es directamente proporcional a la cantidad de analito. Ac: anticuerpos no marcados específicos de la hormona a determinar. Ag: antígeno a valorar, no marcado, en nuestro caso la hormona antimülleriana. Ac*: anticuerpos marcados capaces de unirse a un segundo lugar antigénico de la hormona.

3.2.2. Calibración y control

Los materiales de calibrado y control vienen liofilizados (**Figura 3**) y se reconstituyen a partir de los respectivos kits.



Figura 3. Kit de control PreciControl AMH. (Roche Diagnostics).

3.2.2.1 Calibración

El material de calibrador se prepara añadiendo 1 mL de agua destilada a cada nivel. Los niveles de calibrador se preparan a las concentraciones de 0.0444 ng/mL (Cal 1) y 7.71 ng/mL (Cal 2). Para homogeneizar las disoluciones es preciso dejarlas durante 30 minutos en agitación. Tras su homogeneización, se alicuotan y procesan.

La calibración del sistema se realiza al instalar la técnica en el equipo. Las alícuotas Cal 1 y Cal 2 se analizan automáticamente por duplicado para garantizar la correcta calibración del lote (**Tabla 1**).

Tabla 1. Calibración del equipo Cobas® Pure de Roche Diagnostics con lote 714829.

	Cal 1	Cal 2
Diana (mg/mL)	0,0444	7,71
Señal 1	2114	264206
Señal 2	2132	265851

3.2.2.2 Control

Su finalidad es comprobar el correcto funcionamiento del procedimiento de medición de HAM. El material de control se reconstituye añadiendo 2 mL de agua destilada a cada nivel. Los niveles de control se preparan a las concentraciones de 1.06 ng/mL (Nivel 1) y 5.26 ng/mL (Nivel 2), estipuladas por el fabricante. Para homogeneizar las disoluciones es preciso dejarlas durante 30 minutos en agitación. Los controles fueron alicuotados y almacenados hasta su procesamiento a -20 °C.

3.2.3. Verificación de método

Para estudiar la precisión se usaron 5 alícuotas de 400 µL de cada uno de los controles, Nivel 1 y Nivel 2. Se midieron tres replicados diarios de cada uno de los dos controles durante cinco días.

El error sistemático se estimó analizando bajo condiciones de reproducibilidad los mensurados de los controles Nivel 1 y Nivel 2 durante 20 días. Para ello se utilizaron las 10 alícuotas del estudio de precisión (5 del Nivel 1 y 5 del Nivel 2) y, además, se prepararon 15 alícuotas de 250 µL de cada uno de los niveles de control.

Tanto los datos de precisión como de error sistemático se evaluaron según las directrices de la Comisión de Metrología y Sistemas Analíticos del SEQC.

La linealidad se estudió mediante la dilución de dos muestras distintas, ambas con alta concentración de HAM. Se llevó a cabo una dilución automatizada y una manual de cada una de las muestras y se estudió la relación entre los resultados obtenidos y el grado de dilución.

El límite de detección se comprobó haciendo un pool de sueros de 6 muestras con valor de concentración de HAM de 0.01 ng/mL y llevando a cabo 15 determinaciones repetidas de una alícuota de esta disolución.

El límite de decisión clínica se estudió comprobando la linealidad en las proximidades de este valor, llevando a cabo una comparativa entre los valores obtenidos por ambos métodos mediante Passing-Bablok y, además, estudiando las diferencias mediante un diagrama de Bland-Altman. Para ello, se escogieron 40 muestras con concentraciones de HAM alrededor del límite de decisión clínica, concretamente dentro del rango de 0,1 ng/mL a 1,0 ng/mL.

3.2.4. Comparación de métodos

Se realizó la comparación entre el método de inmunoensayo quimioluminiscente de Beckman Coulter y el método de inmunoensayo electroquimioluminiscente de Roche Diagnostics para la determinación de Hormona Antimülleriana. Para la comparación, se seleccionaron 40 muestras con concentración conocida de HAM, determinada por el equipo Access® 2 de Beckman Coulter, y distribuidas a lo largo del intervalo de medida del método especificado por el fabricante para el equipo de Cobas® Pure de Roche Diagnostics (0.03 ng/mL a 23 ng/mL). Tras la selección, las muestras fueron analizadas por el equipo Cobas® Pure de Roche Diagnostics y se realizó un estudio estadístico para detectar y descartar valores aberrantes.

Mediante un análisis de las diferencias usando el diagrama de Bland-Altman determinamos la posible existencia de sesgo entre los equipos de las dos casas comerciales. Se llevó a cabo un estudio de la linealidad representando gráficamente los valores de concentración de HAM de un equipo frente a los de otro para determinar si es posible efectuar un análisis de regresión.

Y, finalmente, mediante regresión Passing-Bablok se determinó la relación existente entre los datos que proporcionan los distintos equipos de medición de HAM.

3.2.5. Estudio de correlación entre valor de HAM y RFA

Se realizó un estudio sobre la capacidad predictiva de la HAM frente al recuento de folículos antrales. El insert de la técnica de HAM de Roche Diagnostics especifica que con un punto de corte de 1.77 ng/mL, se puede predecir con una alta capacidad diagnóstica a las pacientes con un RFA > 15⁽²⁰⁾.

Para el estudio se revisaron las historias clínica de las pacientes que disponían de una muestra sérica con concentración de HAM cuantizada por la técnica quimioluminiscente de Beckman Coulter. Fueron seleccionadas aquellas historias que reflejaban un recuento de folículos antrales próximo a la fecha de la analítica de las pacientes comprendidas dentro del periodo de estudio.

Para poder definir los parámetros de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo, se trataron a las pacientes con RFA ≤ 15 como “enfermo” y las pacientes con RFA > 15 como “sano”. Además, una prueba analítica con valor de HAM ≤ 1.77 ng/mL se consideró “positiva” y aquella con valor de HAM > 1.77 ng/mL fue considerada “negativa” (**Tabla 2**).

Tabla 2. Tabla 2x2 que refleja los posibles resultados de la prueba diagnóstica.

	Enfermo	Sano
Prueba positiva	VP	FP
Prueba negativa	FN	VN

4. Resultados y discusión

4.1. Verificación de método

Estudio de la precisión

Durante el periodo de estudio se llevaron a cabo 30 determinaciones con el fin de estudiar la imprecisión intraserial (CV_r) y la imprecisión interserial (CV_T) del ensayo electroquimioluminiscente del equipo Cobas® Pure de Roche Diagnostics en las condiciones del laboratorio clínico frente a la imprecisión máxima permitida especificada por el fabricante.

Los resultados obtenidos (**Tabla 3**) mostraron que las variaciones de ambos niveles fueron inferiores a las especificadas por el fabricante (teórica). La variación intraserial e interserial fueron del 1,27%, en comparación con los límites de 1,30% y 2,80% proporcionados para el Nivel 1. Y para el Nivel 2, la variación intraserial fue del 0,74% y la interserial del 0,82%, en comparación con los límites teóricos de 0,80% y 2,90%, respectivamente.

Tabla 3. Imprecisión intra- e interserial obtenida para ambos niveles de control frente a los valores máximos permitidos para el método de determinación de Hormona Antimülleriana de Roche Diagnostics.

	Imprecisión intraserial (CV_r)	Imprecisión en el laboratorio (CV_T)
Teórica Nivel 1	1,30%	2,80%
Experimental Nivel 1	1,27%	1,27%
Teórica Nivel 2	0,80%	2,90%
Experimental Nivel 2	0,74%	0,82%

Los resultados indican que el procedimiento presenta una imprecisión menor que la especificada por el fabricante, lo cual sugiere una alta precisión del método en condiciones reales de uso.

Estudio de reproducibilidad (error sistemático)

Durante el periodo de estudio se llevaron a cabo 40 determinaciones para estudiar el error sistemático asociado al método electroquimioluminiscente de determinación de Hormona Antimülleriana del equipo Cobas® Pure de Roche Diagnostics.

Los resultados mostraron que el error sistemático fue inferior al 10%, punto de evaluación establecido por el estado del arte. En concreto, el error sistemático observado fue del 0,81% para el Nivel 1 y del 2,91% para el Nivel 2. Además, evaluamos si este error sistemático era inferior al descrito por las especificaciones de variabilidad biológica de la European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM)⁽²¹⁾, siendo inferior el error sistemático obtenido para todas las especificaciones, excepto para las especificaciones óptimas en el nivel 2 (**Tabla 4**).

Tabla 4. Error sistemático (%) asociado a cada uno de los niveles de control del PreciControl AMH de Roche Diagnostics para el equipo Cobas® Pure, obtenidos experimentalmente.

	Error sistemático permitido	
Especificación: estado del arte	10,00%	
Especificación EFLM: mínima	7.2%	
Especificación EFLM: deseable	4.8%	
Especificación EFLM: óptima	2.4%	
Error sistemático obtenido	Nivel 1	Nivel 2
	0.81%	2.91%

Los resultados obtenidos demuestran una alta reproducibilidad del método en las condiciones reales del laboratorio clínico.

Estudio de linealidad

La linealidad se estudió mediante la dilución de dos muestras diferentes con alta concentración de HAM (A y B). Se realizó una dilución automatizada de cada una de las muestras, donde el equipo de medición diluyó las muestras a factor de dilución 1, 2, 5 y 10 (**Tabla 5**). Y, por otro lado, se realizó la dilución manual seriada a factor de dilución 1, 2, 4 y 8 (**Tabla 6**).

Tabla 5. Dilución automatizada por el equipo Cobas® Pure de Roche Diagnostics. Factores de dilución, concentración (en ng/mL) de hormona antimülleriana teórica en función de la concentración inicial de las muestras A y B, y concentración en ng/mL de hormona antimülleriana cuantificada por el método.

Muestra	Dilución (automatizada)	HAM teórica	HAM cuantificada
A	1/1	16,4	16,4
	½	8,2	8,65
	1/5	3,28	3,6
	1/10	1,64	1,73
B	1/1	15,3	15,3
	½	7,65	8,2
	1/5	3,06	3,44
	1/10	1,53	1,67

Tabla 6. Dilución manual realizada en el laboratorio de Bioquímica Clínica del HCULB. Factores de dilución, concentración (en ng/mL) de hormona antimülleriana teórica en función de la concentración inicial de la muestra A y B, y concentración en ng/mL de hormona antimülleriana cuantificada por el método.

Muestra	Dilución (manual)	HAM teórica	HAM cuantificada
A	1/1	16,4	16,4
	½	8,2	8,69
	¼	4,1	4,29
	1/8	2,05	2,14
B	1/1	15,3	15,3
	½	7,65	7,98
	¼	3,825	4,08
	1/8	1,9125	2,02

Los valores obtenidos experimentalmente para la concentración de HAM se representaron gráficamente frente a la dilución (**Figura 4**).

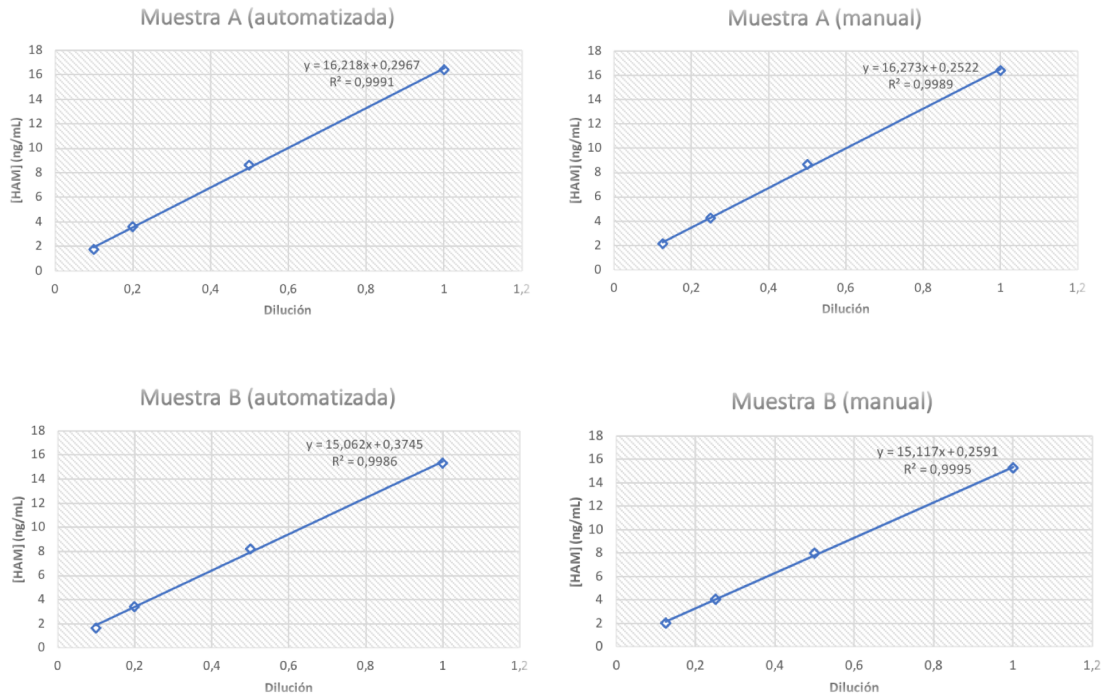


Figura 4. Estudio de la linealidad para las diluciones automatizadas y manuales de las muestras A y B.

El coeficiente de correlación de Pearson obtenido en todos los casos fue mayor a 0.99, indicando una elevada asociación lineal en todo el rango de concentraciones.

Límite de detección

El límite de detección se comprobó llevando a cabo una serie de mediciones repetidas para la determinación de HAM con el equipo Cobas® Pure de Roche Diagnostics (**Tabla 7**).

Tabla 7. Mediciones de la concentración de hormona antimülleriana en el pool de sueros creado con muestras de concentración de HAM = 0.01 ng/mL (según equipo Access® 2 de Beckman Coulter).

Medida	HAM (ng/mL)		
		8	0,00980
1	0,00980	9	0,00980
2	0,00980	10	0,00980
3	0,00980	11	0,00980
4	0,00980	12	0,00980
5	0,00980	13	0,00980
6	0,00980	14	0,00980
7	0,00980	15	0,00980

Todas las mediciones fueron inferiores al limite descrito por la técnica: Límite de Blanco = 0.007 ng/mL, Límite de Detección = 0.01 ng/mL, Límite de Cuantificación = 0.03 ng/mL⁽⁵⁵⁵⁾.

Los resultados obtenidos fueron satisfactorios, demostrando que el método es capaz de detectar consistentemente niveles bajos de HAM con alta precisión.

4.2. Comparación de métodos

Para el estudio de la comparativa de métodos se determinó la concentración de HAM en 40 muestras séricas, comprendidas en el rango lineal de trabajo, con los equipos Access® 2 de Beckman Coulter y Cobas® Pure de Roche Diagnostics.

Análisis de diferencias

El análisis de diferencias por el método de Bland-Altman nos permite evaluar el grado de concordancia entre dos instrumentos que tienen la misma escala de medición. Para ello, se representa de forma gráfica las diferencias entre las mediciones frente a su media⁽²²⁾ (**Figura 5**).

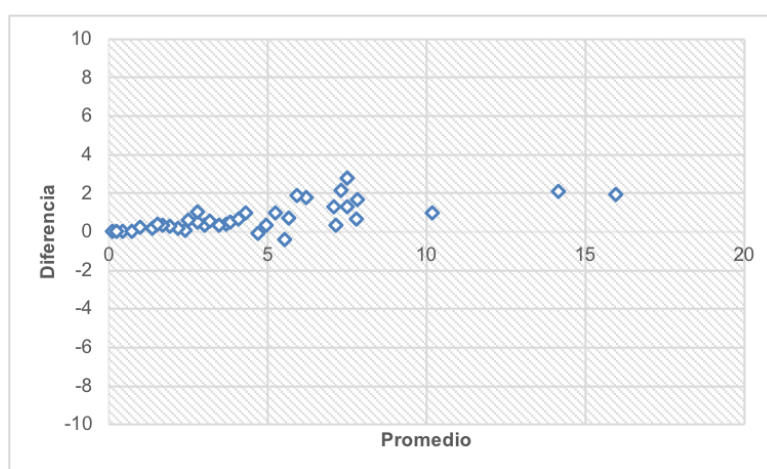


Figura 5. Diagrama Bland-Altman para el estudio de comparación de métodos.

Tabla 8. Media de las diferencias absolutas, su desviación estándar e intervalo de confianza del 95%.

Media de las diferencias absolutas	0,764	
Desviación estándar	0,714	
IC 95% de la media	-0,636	2,164

Los resultados obtenidos para el intervalo de confianza del 95% incluye el valor cero (**Tabla 8**). Por tanto, se puede concluir que no existen diferencias significativas entre los resultados del procedimiento de medida del equipo Access® 2 de Beckman Coulter y los resultados del procedimiento de medida del equipo Cobas® Pure de Roche Diagnostics, según el método de análisis de las diferencias mediante Bland-Altman.

Previo a la regresión lineal, se realizó un estudio de la linealidad (**Figura 6**).

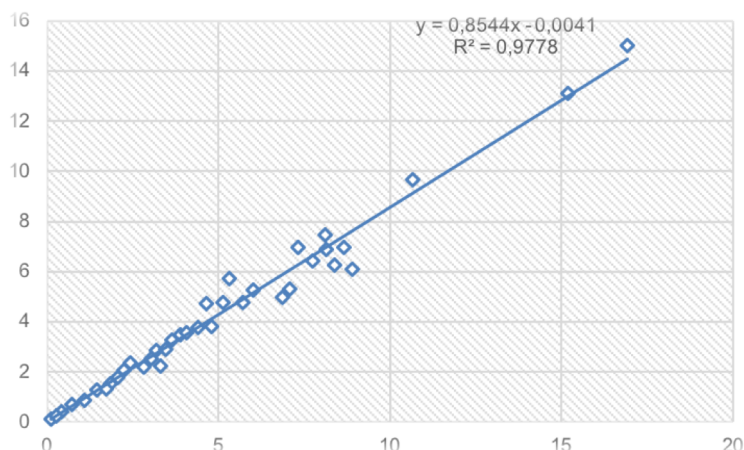


Figura 6. Línea de tendencia de la representación gráfica de los valores de hormona antimülleriana medidas con el equipo Access® 2 de Beckman Coulter (eje X) frente a los valores medidos con el equipo Cobas® Pure de Roche Diagnostics (eje Y).

El resultado de este estudio es un coeficiente de correlación de 0.9778, indicativo de que se puede llevar a cabo la regresión lineal.

Regresión lineal

El análisis de regresión lineal se realizó mediante la técnica Passing-Bablok. Para interpretar los resultados de la regresión lineal son importantes la ordenada en el origen y la pendiente de la recta obtenida mediante esta técnica (**Tabla 9**).

Tabla 9. Pendiente, ordenada en el origen y sus respectivos intervalos de confianza del 95% obtenidos mediante Passing-Bablok.

Pendiente	0,8602	
IC 95%	0,8139	0,9000
Ordenada en el origen	0,0029	
IC 95%	-0,1215	0,1124

El intervalo de confianza del 95% de la pendiente no incluye el valor uno, lo que conlleva que el método de análisis del equipo Cobas® Pure de Roche Diagnostics presenta un error sistemático proporcional con respecto al método de análisis del equipo de referencia Access® 2 de Beckman Coulter.

En resumen, aplicando los criterios estadísticos, se obtuvo como resultado del análisis de diferencias que los resultados de ambas técnicas de determinación de HAM no presentan diferencias significativas y que, por tanto, proporcionan resultados intercambiables. Sin embargo, mediante la técnica estadística de regresión lineal Passing-Bablok, determinamos que la técnica de electroquimioluminiscencia del equipo Cobas® Pure de Roche Diagnostics presenta un error sistemático proporcional con respecto a la técnica de quimioluminiscencia del

equipo Access® 2 de Beckman Coulter. Los resultados obtenidos con las dos técnicas no se pueden considerar comparables puesto que no se cumplen los dos criterios de intercambiabilidad.

4.2.1 Comparación de métodos en el límite de decisión clínica

El límite de decisión clínica se estudió determinando con el ensayo del equipo Cobas® Pure de Roche Diagnostics 40 muestras cuya concentración de HAM medida con el equipo de referencia Access® 2 de Beckman Coulter se encontraba en un rango de valores cercanos al límite de decisión fijado de 0.06 ng/mL.

Análisis de diferencias

Se representaron gráficamente las diferencias absolutas de las mediciones de ambos equipos frente a la media en un gráfico de Bland-Altman (**Figura 7**).

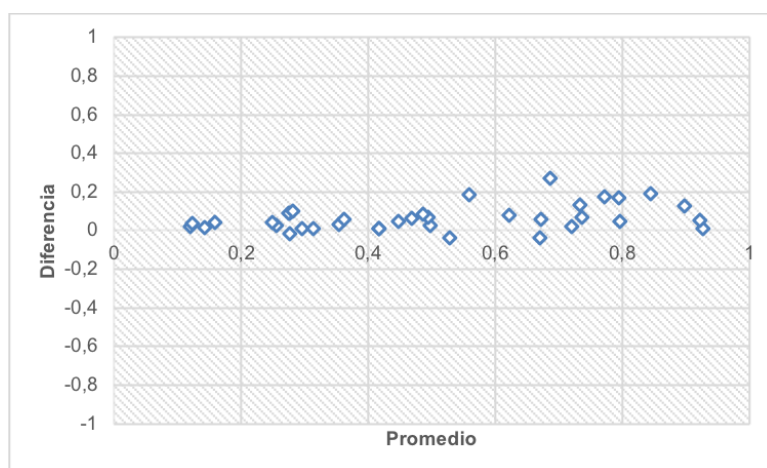


Figura 7. Diagrama Bland-Altman para el estudio del límite de decisión clínica.

Tabla 10. Media de las diferencias absolutas, su desviación estándar e intervalo de confianza del 95%.

Media de las diferencias absolutas	0,069	
Desviación estándar	0,062	
IC 95% de la media	-0,053	0,191

Los resultados de este análisis nos indican que no existen diferencias significativas entre los resultados de los procedimientos de medida de los equipos de Beckman Coulter y Roche Diagnostics. El intervalo de confianza del 95% incluye el valor cero (**Tabla 10**).

También se estudió la linealidad representando gráficamente los datos obtenidos con con un equipo frente a los obtenidos con el otro (**Figura 8**).

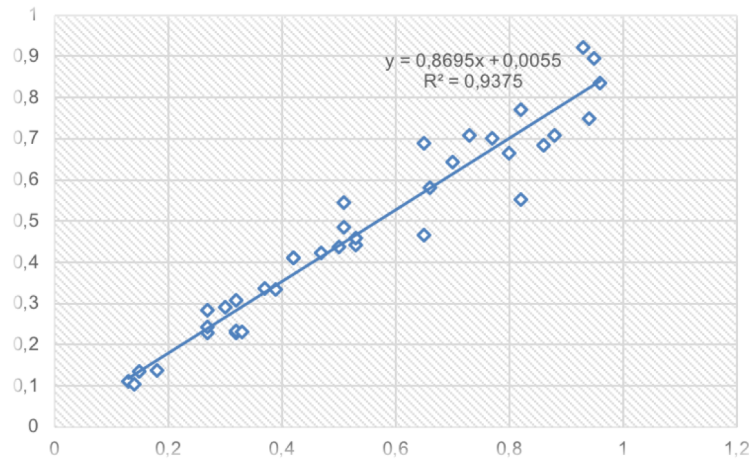


Figura 8. Línea de tendencia de la representación gráfica de los valores de hormona antimülleriana medidas con el equipo Access® 2 de Beckman Coulter (eje X) frente a los valores medidos con el equipo Cobas® Pure de Roche Diagnostics (eje Y).

Se obtuvo una línea de tendencia con valor del coeficiente de Pearson, r , de 0.9375; insuficiente para proceder al análisis de regresión lineal. Para realizar un análisis de regresión lineal sería necesario ampliar el tamaño del rango muestral. Sin embargo, esto no se llevó a cabo, ya que ese estudio está comprendido en la comparación de métodos.

4.3. Estudio de correlación

Tabla de contingencia

Durante el periodo de estudio se llevó a cabo la determinación de la HAM con el método analítico de Roche Diagnostics en 49 muestras de pacientes cuya historia clínica documentaba el recuento de folículos antrales.

Aplicando los valores de corte especificados por el fabricante del método y mediante el análisis de la tabla de contingencia obtenida (**Tabla 13**) estudiamos la relación existente entre el valor sérico de la HAM y el RFA.

Tabla 13. Tabla 2x2 de la distribución de pacientes en función del recuento de folículos antrales y del valor de la determinación de hormona antimülleriana en suero.

	RFA ≤ 15	RFA > 15	Total
HAM ≤ 1.77 ng/mL	29	1	30
HAM > 1.77 ng/mL	9	10	19
Total	38	11	49

Haciendo uso de los datos de la **Tabla 13** podemos calcular los parámetros de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo para la prueba diagnóstica (**Tabla 14**).

Tabla 14. Datos experimentales obtenidos para los parámetros de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la prueba diagnóstica.

		IC 95%	
		Límite inferior	Límite superior
Sensibilidad	76,32%	59,38%	87,97%
Especificidad	90,91%	57,12%	99,52%
Valor predictivo positivo	96,67%	80,95%	99,83%
Valor predictivo negativo	52,63%	29,49%	74,79%

Los resultados indican que el método diagnóstico presenta una alta especificidad y valor predictivo positivo, en concreto, del 90.91% y del 96.67%, respectivamente. Esto sugiere que si se tiene una concentración de hormona antimülleriana sérica por debajo o igual al punto de corte de 1.77 ng/mL, existe una alta probabilidad de tener un recuento de folículos antrales menor o igual a 15. Sin embargo, la sensibilidad y el valor predictivo negativo son relativamente más bajos, del 76.32% y 52.63% respectivamente. Esto implica que si la paciente presenta unos niveles séricos de hormona antimülleriana mayores a 1.77 ng/mL, el método no presenta una buena capacidad diagnóstica para predecir un recuento de folículos antrales mayor a 15.

5. Conclusiones

- La verificación del método electroquimioluminiscente para la determinación de Hormona Antimülleriana del equipo Cobas® Pure de Roche Diagnostics demostró que es un procedimiento preciso y reproducible en las condiciones reales del laboratorio clínico. Además, presenta una elevada asociación lineal en todo el rango de concentraciones, incluyendo las inmediaciones del límite de detección (0.01 ng/mL).
- Las técnicas de medición de Hormona Antimülleriana basadas en inmunoensayo quimioluminiscente para el equipo Access® 2 de Beckman Coulter e inmunoensayo electroquimioluminiscente para el equipo Cobas® Pure de Roche Diagnostics no proporcionan resultados intercambiables.
- La determinación de Hormona Antimülleriana mediante el inmunoensayo electroquimioluminiscente del equipo Cobas® Pure de Roche Diagnostics presenta un elevado valor predictivo positivo.

6. Bibliografía

- ⁽¹⁾ Hampl, R., Šnajderová, M., & Mardešić, T. (2011). Antimüllerian hormone (amh) not only a marker for prediction of ovarian reserve. *Physiological Research*, 60(2), 217–223. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932076>
- ⁽²⁾ Image from the RCSB PDB ([RCSB.org](https://www.rcsb.org/)) of PDB ID 7L0J (Hart, K.N., Thompson, T.B., Structure of AMH bound to AMHR2-ECD (2021) National Institutes of Health/National Institute of Environmental Health Sciences (NIH/NIEHS)).
- ⁽³⁾ Visser, J. A., de Jong, F. H., Laven, J. S. E., & Themmen, A. P. N. (2006). Anti-Müllerian hormone: A new marker for ovarian function. *Reproduction*, 131(1), 1–9. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00529>
- ⁽⁴⁾ Josso, N., Rey, R. A., & Picard, J. Y. (2013). Anti-Müllerian hormone: A valuable addition to the toolbox of the pediatric endocrinologist. *International Journal of Endocrinology*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/674105>
- ⁽⁵⁾ La Marca, A., Sighinolfi, G., Radi, D., Argento, C., Baraldi, E., Arsenio, A. C., Stabile, G., & Volpe, A. (2009). Anti-Müllerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Human Reproduction Update*, 16(2), 113–130. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp036>
- ⁽⁶⁾ Camaró-Sala, M. L., Martínez-García, R., Olmos-Martínez, P., Catalá-Cuenca, V., Ocete-Mochón, M. D., & Gimeno-Cardona, C. (2015). Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(7), e31–e36.
- ⁽⁷⁾ Solé Llop, E., Ruiz, Budría, J., & Puente Lanzarote, J. J. (2020). Procedimiento de verificación/validación de procedimientos de medida.
- ⁽⁸⁾ Martínez Morillo, E., Gella Tomás, F. J., Alonso Nieva, N., Boned Juliani, B., Canalías Reverter, F., Izquierdo Álvarez, S., & Serrat Orús, N. (2011). Recomendaciones para el estudio de la veracidad en el laboratorio clínico mediante la comparación de procedimientos de medida. *Química Clínica*.
- ⁽⁹⁾ Gella Tomás, F. J., Alonso Nieva, N., Boned Juliani, B., Canalías Reverter, F., Esteve Poblador, S., Izquierdo Álvarez, S., López Martínez, R., Macías Blanco, C., Rigo Bonnín, R., & Serrat Orús, N. (2013). Validación analítica de los procedimientos de medida del laboratorio clínico. 70–75.
- ⁽¹⁰⁾ Clinical and Laboratory Standards Institute. (2003). Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. In NCCLS Document EP6-A (Vol. 23, Issue 16).
- ⁽¹¹⁾ Sánchez Manrique, M., Gella Tomás, F. J., Bastida Castellví, J., Canalías Reverter, F., & Ruiz Morer, R. (2004). Recomendaciones para el estudio de la capacidad de detección de los procedimientos de medida en el laboratorio clínico. 23(6), 439–441.
- ⁽¹²⁾ Trigo-Orsini, M. L., & Parra-Poma, C. M. (2020). Determinación de límites de decisión clínica de ciclosporina en sangre en pacientes con trasplante renal. *Revista CON-CIENCIA*, 8(1), 53–66.

http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310-02652020000100005&lng=es&nrm=iso&tlng=es

⁽¹³⁾ Solé Llop, E., Ruiz Budría, J., & Puente Lanzarote, J. J. (2020). Procedimiento de verificación de la intercambiabilidad de resultados entre equipos (Vol. 3).

⁽¹⁴⁾ Prada de Medio, E., Blázquez Sánchez, R., Perich Alsina, C., Gutiérrez Bassini, G., Pineda Tenor, D., Álvarez Ríos, A. I., Salas García, Á., Jou Turallas, J. M., Cuadrado Cenzual, M. Á., Morancho Zaragoza, J., Ricós Aguilá, C., Cobo del Hoyo, M. J., Calafell Clar, R., & Bauzá, F. R. (2014). Verificación de la intercambiabilidad de resultados entre equipos duplicados. *Revista Del Laboratorio Clínico*, 7(1), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.labcli.2014.02.004>

⁽¹⁵⁾ Pum, J. (2019). A practical guide to validation and verification of analytical methods in the clinical laboratory (G. S. B. T.-A. in C. C. Makowski (ed.); Vol. 90, pp. 215–281). Elsevier.

⁽¹⁶⁾ Fernández, P., & Díaz, P. (2003). Pruebas diagnósticas. 1–6.

⁽¹⁷⁾ Vizcaíno-Salazar, G. J. (2017). Importancia del cálculo de la sensibilidad, la especificidad y otros parámetros estadísticos en el uso de las pruebas de diagnóstico clínico y de laboratorio. *Medicina y Laboratorio*, 23(7–8), 365–386. <https://doi.org/10.36384/01232576.34>

⁽¹⁸⁾ Fernández Castro, C., Rodelgo Jiménez, L., Ruiz Ginés, M. Á., & Ruiz Martín, G. (2011). El laboratorio clínico y la función hormonal. Preanalítica, analítica, postanalítica y calidad. In *LABCAM (Asociación Castellano-Manchega de Análisis Clínicos)* (Issue January).

⁽¹⁹⁾ Martín-Calderón, J. L. (2021). Biotin interference in several electrochemiluminescence immunoassays (eclia). *Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia*, 87(87(03)), 239–246. <https://doi.org/10.53519/analesranf.2021.87.03.02>

⁽²⁰⁾ Roche Diagnostics (n.d.). Elecsys AMH cobas. 2–7.

⁽²¹⁾ Aarsand AK, Fernandez-Calle P, Webster C, Coskun A, Gonzales-Lao E, Diaz-Garzon J, Jonker N, Simon M, Braga F, Perich C, Boned B, Marques-Garcia F, Carobene A, Aslan B, Sezer E, Bartlett WA, Sandberg S. The EFLM Biological Variation Database. <https://biologicalvariation.eu/> [30.05.2024].

⁽²²⁾ Manterola, C., Grande, L., Otzen, T., García, N., Salazar, P., & Quiroz, G. (2018). Confiabilidad, precisión o reproducibilidad de las mediciones. *Revista Chilena de Infectología*, 35(6), 680–688. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v35n6/0716-1018-rci-35-06-0680.pdf>