



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA  
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
LABORATORIO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL



**DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DE PROTOCOLOS DE  
VERIFICACIÓN ANALÍTICA PARA EVALUAR EL DESEMPEÑO  
DE UN KIT CUANTITATIVO DE SODIO**

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de  
Licenciada en Bioanálisis

**Autora:**

Anabel C. Contreras Ruiz.

**Tutora:**

Dra. Libia Y. Contreras Méndez.

Mérida, Mayo de 2019

## DEDICATORIA

- A Dios todopoderoso por nunca abandonarme en los momentos más difíciles, por darme la fuerza necesaria para siempre levantarme y no decaer, ya que siempre en la vida habrá una solución y sobre todo una luz al final del túnel.
- A mi familia Antonio Contreras, Belkys Ruiz y María Eugenia Contreras, pilar fundamental, ejemplo de amor, perseverancia, respeto; gracias por sus consejos, apoyo y guiarme siempre por el camino correcto, este logro es para ustedes.
- A la familia Ruiz y Contreras, por su apoyo y por brindarme esa mano amiga en todo momento.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad de Los Andes, por darme la oportunidad de cumplir esta meta trazada.
- A la Profesora Libia Contreras, por sus consejos, conocimientos y por haber dedicado parte de su valioso tiempo para la culminación de esta meta.
- A las jurados, Profesoras Carmen Zulay Labrador, Ledy Linares, Anunziata De Santis, por las correcciones y sugerencias realizadas durante el proceso de elaboración y culminación del presente trabajo de investigación.
- A todas las personas que de una u otra manera colaboraron, especialmente a las personas que conforman el laboratorio de Análisis Instrumental, por su apoyo y abrirme las puertas para el desarrollo de dicho trabajo de grado.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
<b>VEREDICTO</b>	ii
<b>DEDICATORIA</b>	iii
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	iv
<b>ÍNDICE DE CONTENIDO</b>	v
<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y ESQUEMAS</b>	viii
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	ix
<b>RESUMEN</b>	xi
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>CAPÍTULO I. EL PROBLEMA</b>	3
<b>Planteamiento del problema</b>	3
<b>Justificación e importancia de la investigación</b>	4
<b>Objetivos de la investigación</b>	6
Objetivo general	6
Objetivos específicos	6
<b>CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO</b>	7
<b>Antecedentes</b>	7
<b>Bases teóricas</b>	11
<b>Calidad y normalización en el laboratorio clínico</b>	11
Normalización a nivel internacional	12
Normalización a nivel nacional	14
<b>Sistema de gestión de la calidad en el laboratorio clínico</b>	15
<b>Protocolos</b>	17
<b>Evaluación de métodos analíticos</b>	19
Características analíticas de los métodos	20
Características de funcionamiento del método	26
Validación	27
Verificación	27
<b>Calibración instrumental</b>	28

<b>Espectrofotetría de absorción molecular</b>	29
<b>Sodio en fluidos biológicos</b>	31
<b>Métodos para determinar sodio en suero sanguíneo</b>	33
<b>Glosario de términos básicos</b>	35
<b>CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO</b>	38
Tipo de investigación	38
Diseño de la investigación	38
Procedimiento de la investigación	38
Diseño de análisis	40
Alcances y limitaciones	40
<b>METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</b>	41
Método analítico para determinar sodio en suero (Kit reactivo Dabis)	41
Materiales, equipos, reactivos y sueros control	41
Procedimientos experimentales	45
Procedimiento de calibración instrumental del espectrofotómetro	45
Procedimiento analítico del kit reactivo de sodio (marca Dabis)	46
Procedimiento de verificación de la precisión	47
Procedimiento de verificación de la linealidad	48
Procedimiento de verificación de la exactitud	49
<b>CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	50
Calibración instrumental del espectrofotómetro Genesys™ 20	50
Protocolo de calibración instrumental	50
Estandarización de las condiciones de trabajo del kit reactivo de sodio (Dabis)	54
Condiciones óptimas del kit reactivo de sodio	59
Verificación del kit reactivo de sodio	60
Precisión	60
Linealidad	62
Elaboración del protocolo de verificación analítica	65
Protocolo de verificación analítica	71
<b>CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	74
Conclusiones y recomendaciones	74

<b>BIBLIOHEMEROGRAFÍA</b>	76
<b>ANEXOS</b>	83
Procedimientos para llevar a cabo la calibración instrumental	84
Inserto del kit reactivo de sodio (Dabis)	89
Literatura suero control comercial	90

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura N°</b>		<b>Pág.</b>
1	Arborización de documentos de un SGC.	17
2	Comprobación de la linealidad del método mediante el coeficiente de correlación de la recta de calibrado.	24
3	Intervalo lineal o rango.	25
4	Principales componentes de un espectrofotómetro de absorción molecular.	31
5	Principio del método espectrofotométrico (Dabis).	41
6	Espectrofotómetro GENESYS™ 20, marca Thermo Scientific.	43
7	Curva de calibración para la determinación de sodio en suero por espectrofotometría de absorción molecular.	63

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

<b>Esquema N°</b>		<b>Pág.</b>
1	Esquema del diseño experimental.	39
2	Procedimiento para el tratamiento de las muestras	57

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°		Pág.
1	Normas emitidas por la ISO para la certificación y acreditación de los laboratorios.	13
2	Clasificación de los métodos analíticos.	20
3	Características analíticas de los métodos.	21
4	Procedimiento analítico del kit reactivo de sodio (marca Dabis).	46
5	Procedimiento para la preparación del suero control comercial.	47
6	Preparación de las diluciones para el estudio de la linealidad.	48
7	Parámetros evaluados en el control de calidad instrumental con sus respectivos resultados.	51
8	Protocolo de calibración instrumental.	52
9	Absorbancias del blanco, estándar 150 mEq/L, muestra y suero control, con sus respectivos promedios, S y CV% luego del agregado simultaneo del reactivo de color.	54
10	Absorbancias del blanco, estándares (30, 75 y 150 mEq/L), suero control y muestra, con sus respectivos promedios, CV% y S empleando tiempos exactos de lectura.	56
11	Absorbancias del blanco y suero control con sus respectivos cálculos estadísticos empleando pipetas volumétricas.	58
12	Absorbancias del blanco y suero control con sus respectivos cálculos estadísticos, empleando pipetas automáticas.	59
13	Condiciones óptimas del kit reactivo de sodio (Dabis).	59
14	Resultados obtenidos del día 1 y 2 para la valoración precisión intra-corrída.	60
15	Promedio de ambos días, concentración de sodio (mEq/L), S y CV% para la valoración de la precisión inter-corrída.	61
16	Comparación de los resultados obtenidos con las especificaciones del fabricante del kit, para establecer la verificación de la precisión.	61
17	Promedio de las absorbancias obtenidas por el blanco y estándares de 30,75 y 150 mEq/L, para el estudio de la linealidad del método.	62



<b>Tabla N°</b>		<b>Pág.</b>
18	Comparación de los resultados obtenidos en el laboratorio con los declarados por el fabricante del kit reactivo, en la verificación analítica de la linealidad.	64
19	Portada, objeto, aplicación, responsables y documentos de referencia en el protocolo de verificación analítica del método.	65
20	Información previa necesaria en el protocolo de verificación analítica del método.	66
21	Planificación y familiarización del método en el protocolo de verificación analítica.	67
22	Procedimientos experimentales a tomar en consideración para la precisión, linealidad y exactitud en el protocolo de verificación analítica.	67
23	Especificaciones de calidad declaradas por el fabricante del kit y criterios a considerar en el protocolo de verificación analítica.	69
24	Informe de verificación analítica, comparación de los resultados obtenidos con las especificaciones del fabricante del kit.	70
25	Protocolo de verificación analítica.	71

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
LICENCIATURA EN BIOANÁLISIS**



**DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DE PROTOCOLOS DE  
VERIFICACIÓN ANALÍTICA PARA EVALUAR EL DESEMPEÑO DE UN  
KIT CUANTITATIVO DE SODIO**

**Autora:** Anabel C. Contreras Ruiz.

**Tutora:** Prof. Libia Y. Contreras Méndez.

**RESUMEN**

En el proceso de verificación de métodos se obtienen datos del desempeño del mismo en las condiciones de trabajo del laboratorio; luego los resultados son cotejados con las especificaciones brindadas por el fabricante de reactivos y con los criterios de aceptabilidad establecidos. El objetivo principal de la presente investigación es desarrollar e implementar protocolos de verificación analítica para introducir el uso de un kit de diagnóstico, comercial, para cuantificar sodio por espectrofotometría de absorción molecular con el fin de verificar las características analíticas del método en las condiciones de trabajo del laboratorio. En este sentido, se procedió a la verificación del método, evaluando los parámetros: precisión y linealidad, obteniendo resultados favorables, demostrándose con hechos que el mismo refleja un coeficiente de correlación ( $r$ ), con un ajuste perfecto, de  $-0,9997$  y una excelente precisión (inter-corrida e intra-corrida) necesaria para su aplicación como método espectrofotométrico alternativo para la cuantificación de sodio en suero en los laboratorios clínicos. Además, en la investigación se contemplan los procedimientos de verificación analítica a llevar cabo para la precisión, linealidad y exactitud del método. Con los procedimientos estipulados para cada parámetro, y los conocimientos analíticos y estadísticos proporcionados se procedió a la elaboración de los protocolos de verificación de la precisión, linealidad y exactitud, herramienta clave, necesaria para la evaluación de los métodos analíticos, sirviendo como herramientas de gran ayuda para los profesionales del bioanálisis al momento de verificar el desempeño de cualquier método analítico.

**Palabras claves:** laboratorios clínicos, protocolos, verificación, métodos, precisión, linealidad, exactitud

## INTRODUCCIÓN

El laboratorio clínico se define como el lugar donde se realizan las determinaciones analíticas en muestras biológicas humanas, cuya principal finalidad es proveer al médico información para la prevención, diagnóstico, pronóstico y control de ciertas enfermedades, es decir, proporcionar resultados clínicamente relevantes ([González, 2010](#); [Galindo y Sánchez, 2017](#)). La información que aporta el laboratorio es de gran importancia, en un elevado porcentaje de casos la decisión tomada por el médico respecto a la actuación sobre el paciente está basada en ésta; por este motivo, la calidad de los resultados analíticos es esencial. Todas las etapas (preanalítica, analítica y post analítica) por las que atraviesa una muestra en el laboratorio clínico deben estar controladas por un sistema de gestión de la calidad, ya que cualquier error podría potencialmente tender consecuencias negativas sobre los pacientes ([Fuentes, s.f](#); [Purita et al., 2011](#)).

Existen varios trabajos publicados que hablan sobre el porcentaje de errores, atribuido a cada una de las etapas mencionadas. Los trabajos coinciden en ubicar al mayor porcentaje de errores en la etapa preanalítica, luego se ubicarían en un segundo lugar los errores postanalíticos y en el último lugar estarían los errores analíticos ([Purita et al., 2011](#); [Gil, Franco y Galbán, 2016](#)). Los errores analíticos vienen atribuidos principalmente a la no evaluación de los métodos, que incluyen la validación y verificación de los mismos. En este sentido, la selección, aplicación y evaluación de los diferentes procedimientos analíticos constituyen el factor fundamental, que se hace necesario revisar siempre, cuando se trata de conocer la calidad con que se desempeña el laboratorio clínico ([Purita et al., 2011](#)).

La fase analítica contempla la verificación de los procedimientos y métodos analíticos. Estos procedimientos deben tener asignadas unas especificaciones con el fin de garantizar un determinado nivel de calidad ([Fernández y Mazziotta, 2005](#)). Generalmente, los laboratorios clínicos emplean Kits de diagnóstico in vitro donde los procedimientos analíticos son especificados en las instrucciones técnicas

proporcionadas por los fabricantes. Dichos procedimientos se consideran normalizados y han sido generalmente validados por el fabricante (Izquierdo et al., 2014). Cuando se adopta un método normalizado sin ninguna modificación, el laboratorio tiene la responsabilidad de verificar las características de desempeño del método en su propia situación, antes de ser utilizado para los análisis de las muestras de pacientes (Espejo, 2016; Entidad Nacional de Acreditación [ENAC], 2017).

La verificación permite demostrar que el método aporta resultados satisfactorios antes de comenzar a utilizarlo, por lo que es de fundamental importancia, ya que establece el desempeño del método en las condiciones de trabajo del laboratorio (Camaró et al., 2013; Guglielmono, Elías, Kiener, Collino y Barzón, 2011). La verificación consiste en comprobar que las prestaciones analíticas especificadas en el procedimiento cumplen los requisitos metrología establecidos por el laboratorio. Además, debe obtenerse una estimación de, al menos, la imprecisión interdiaria obtenida en las condiciones habituales de trabajo y comprobar que cumple el requisito establecido (Izquierdo et al., 2014).

El laboratorio debe documentar el procedimiento de verificación utilizado y registrar los resultados obtenidos. Los resultados de la verificación deben ser revisados por personal cualificado para ello y debe registrarse dicha revisión (Izquierdo et al., 2014). Para realizar adecuadamente la verificación analítica es conveniente diseñar protocolos que serán una herramienta clave para el profesional del laboratorio, evaluar de forma sencilla los parámetros básicos de desempeño analítico pudiendo de esta forma verificar el método analítico a emplear en el laboratorio (Brambila, 2009; Zamora, 2011).

En base a lo anteriormente expuesto, en este trabajo nos planteamos desarrollar e implementar protocolos de verificación analítica para introducir el uso de un kit de diagnóstico, comercial, para cuantificar sodio por espectrofotometría de absorción molecular con el fin de verificar las características analíticas del método en las condiciones de trabajo del laboratorio, antes de ser utilizado para los análisis de muestras reales.

# CAPÍTULO I

## EL PROBLEMA

### Planteamiento del problema

En América Latina, es poco frecuente en los distintos países de la región evaluar el desempeño de los procedimientos de prueba empleando herramientas de Validación/Verificación; por ende, se realizaba el control de calidad de los procedimientos de medida sin conocer los parámetros de desempeño ([Westgard et al., 2013](#)).

Con la creciente cultura de la calidad entre los laboratorios clínicos, también ha aumentado la necesidad de evaluar el desempeño de los métodos de análisis para la realización de los exámenes ofrecidos a sus pacientes ([Zamora, 2011](#)). Es por ello, que la Norma ISO 15189 contempla los requisitos de gestión y técnicos que un laboratorio debe implementar para acreditar diferentes análisis clínicos; dentro de los requisitos técnicos se establecen pautas para la verificación de los métodos de análisis aunque no se especifica la forma en que se debe llevar a cabo tal procedimiento ([Guglielmone et al., 2011](#)).

El principal problema identificado en los laboratorios clínicos acreditados es la verificación de los métodos de medida, por lo que es un aspecto en el que no se está familiarizado, especialmente porque no hay un requisito regulatorio a este respecto en las normas oficiales aplicables ([Quintana, Rea y Barlandas, 2016](#)).

En Latinoamérica, especialmente en Venezuela la mayoría de los laboratorios clínicos omiten el proceso de verificación, como es el caso de los métodos espectrofotométricos que emplean kits reactivos; por lo que confían en los parámetros de calidad aportados por el fabricante, muchas veces, éstos no cumplen con las especificaciones indicadas, ocasionándose errores en la toma de decisiones al reportar los resultados ([Centro Nacional de Metrología \[CENAM\], 2008](#); [Molero et al., 2013](#)). Esta problemática es posible solventar a través del desarrollo e

implementación de protocolos de verificación. A partir de este análisis se delimita el problema, por lo que se planteó la siguiente interrogante:

¿Se podrá desarrollar e implementar protocolos de verificación analítica para evaluar el desempeño de un kit cuantitativo de sodio en el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde enero 2018 hasta marzo 2019?

### **Justificación e importancia de la investigación**

La verificación en los laboratorios clínicos se ha convertido en una práctica poco frecuente para la evaluación de los métodos analíticos, principalmente por dos aspectos, la no aplicación de protocolos y el desconocimiento del personal de cómo evaluar analítica y estadísticamente los parámetros de desempeño del método ([Purita et al., 2011](#)).

La no aplicación de protocolos de verificación, viene dado a que las normas para la gestión de la calidad en los laboratorios clínicos, como la ISO 15189 e ISO 9001, que estipulan pautas para la verificación, no especifican las instrucciones o pasos que se deben llevar a cabo para la evaluación de los parámetros de desempeño del método, establecidos por el fabricante del kits reactivo, por lo que no los desarrollan o en su defecto, no disponen de los mismos. También, viene dado a que los analistas no cuentan con el conocimiento necesario para la elaboración de los protocolos ([Guglielmone et al., 2011](#); [Fernández et al., 2005](#)).

En cuanto al conocimiento del personal, en una encuesta llevada a cabo a 44 laboratorios en México, solo el 15% del personal de los laboratorios encuestados dijo tener un conocimiento de 100% en validación y verificación de métodos, lo cual representa una cifra preocupante, ya que los laboratorios clínicos consideran que la validación y verificación de métodos es uno de los requisitos más complicados de cumplir en un proceso de acreditación, debido a que implica inversión de tiempo en el laboratorio, así como un reto en lo académico para los analistas ([Quintana et al., 2016](#)).

La situación actual de los laboratorios clínicos de Latinoamérica se caracteriza por un nivel insuficiente de confiabilidad en los resultados, lo que se ha observado en datos de garantía de calidad en países miembros de la Confederación Latinoamericana de Bioquímica Clínica (COLABIOCLI). Particularmente, en Venezuela se ha observado falta de interés por parte de las autoridades nacionales y regionales sobre la calidad de los exámenes que realizan los diferentes laboratorios de su jurisdicción, siendo esta de calidad baja y con una confiabilidad preocupante según estudios realizados a lo largo de los años en distintos sectores del país ([Falcón et al., 2014](#); [Acosta y Nunes, 2017](#)).

Cada día, los niveles de confiabilidad de los resultados generados en el laboratorio se ven afectados; es evidente que la no verificación de los métodos de medida repercute directamente en la confiabilidad de los mismos. Es importante recordar, que la obtención de resultados clínicamente relevantes conllevan a un buen diagnóstico, punto crítico de mayor importancia en la atención médica, ya que de éste depende tanto el pronóstico como el tratamiento y donde el laboratorio clínico juega un papel central ([Cruz et al., 2014](#)).

Por tal motivo, en nuestra investigación se planteó la necesidad de desarrollar protocolos de verificación que faciliten la evaluación de los parámetros analíticos que se encuentran en los insertos de los kits reactivos, determinando si estos cumplen o no con las especificaciones declaradas por el fabricante del mismo; asegurando resultados clínicamente útiles satisfaciendo las necesidades de los usuarios (pacientes y profesionales del área de la salud) en primera instancia en el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes y en un futuro próximo en laboratorios de análisis clínico. Además, proporcionar los conocimientos necesarios que resulten especialmente favorables para estimular al profesional del Bioanálisis a implementar protocolos de verificación bajo las condiciones de rutina de su propio laboratorio, cumpliendo con uno de los elementos del sistema de gestión de la calidad.

## **Objetivos de la investigación**

### ***Objetivo General***

Desarrollar e implementar protocolos de verificación para evaluar el desempeño de un kit para determinar sodio en suero, en el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, desde enero 2018 hasta marzo 2019.

### ***Objetivos Específicos***

- Evaluar la precisión, la linealidad y la exactitud del kit para determinar sodio en suero.
- Cotejar los parámetros de desempeño, del kit para determinar sodio en suero, determinados en el Laboratorio de Análisis Instrumental con los declarados, en el inserto, por el fabricante.
- Desarrollar los protocolos de verificación analítica para evaluar el desempeño de métodos espectrofotométricos comerciales que emplean Kits de reactivos.



## CAPITULO II MARCO TEÓRICO

### ANTECEDENTES

Si bien es cierto, antes de 1950 existían pocos programas de control de calidad en los laboratorios clínicos; los cuales se realizaban para comprobar que los resultados fuesen exactos y precisos. Fue hasta 1947, cuando Belk y Sunderman revelaron una dispersión alarmante en los resultados analíticos de los diferentes laboratorios, lo que desencadenó un enorme interés por los métodos para la obtención de buenos resultados analíticos, desde entonces la calidad de los análisis ha aumentado en forma progresiva (Guillén, 2014).

Es por ello, que Gella (1998), hace mención a la importancia que tiene el laboratorio clínico de producir resultados analíticos de utilidad para el diagnóstico, pronóstico, control de la evaluación, control del tratamiento y prevención de enfermedades; por lo que considera evidente disponer de un sistema que asegure la calidad de los resultados. Así mismo, hace referencia a que estos sistemas deben disponer de políticas de calidad específicas, es posible que se desarrollen mediante una oportuna gestión, procedimientos documentados, registros, capacitación del personal, controles, verificaciones o validaciones.

A finales de los años 90, por iniciativa de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) los laboratorios de referencia de la mayoría de los países de América Latina pasaron a participar en programas de control de calidad, debido a las solicitudes contenidas en las normativas de los países y por recomendación de entidades internacionales. Muchos de los laboratorios, pasaron a funcionar como centros organizadores en el desarrollo interno de cada país de esos mismos programas, ejecutando herramientas de validación/verificación para la evaluación del desempeño de los métodos analíticos (Sáenz, Albajar, Valpassos, Abol, 2010).

Por lo antes expuesto, Delgado (2009) se vio en la necesidad de establecer la diferencia entre validación y verificación de los métodos de ensayos, debido a que durante el proceso de acreditación de los laboratorios, los auditores se

enfrentan al problema de establecer la diferencia entre ambos, para ello, describió brevemente los parámetros de validación como indicadores característicos del desempeño del método, así mismo, presentó algunos contenidos de métodos normalizados indicando las especificaciones a partir de los datos de validación, por último describe el proceso de verificación como la confirmación de las especificaciones del método.

Por otro lado, en México, Zamora (2011) ejemplifica y compara dos protocolos, la guía EP15-A2 user verification of performance for precision and trueness, propuesta 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, publicado por la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA), con la finalidad de poder realizar evaluaciones comparativas y prospectivas para saber cuál de los métodos propuestos refleja mejor el desempeño de los métodos analíticos, brindando la información necesaria para que el analista pueda tomar la decisión de escoger el protocolo ideal, para verificar el desempeño del método utilizado en su laboratorio con las especificaciones del fabricante; específicamente en estos protocolos se lleva a cabo la verificación de la precisión, así como sus criterios de aceptación. Con los resultados obtenidos en cada uno de los métodos, consideraron que la guía EP15-A2, es mucho más compleja debido a la dificultad que presenta el modelo matemático, es por ello que posee mayor solidez metrológica para evaluar la imprecisión, pero basta con familiarizarse con la metodología para entender que es muy práctico y útil. Por otra parte, la guía emitida por la EMA, es mucho más sencillo y no es menos confiable que el primero, por su fácil aplicación e interpretación sin perder su validez metrológica, en la que concluyó que ambos protocolos son herramientas estadísticas fundamentales que le permiten al profesional del laboratorio evaluar confiablemente el desempeño de sus métodos analíticos.

En este mismo año, en la Provincia de Buenos Aires (Argentina), Guglielmo et al., (2011); realizaron una investigación con el fin de aplicar los protocolos de evaluación de métodos publicados en guías internacionales (CLSI,

Clinical Laboratory Standard Institute) para verificar el correcto rendimiento de las metodologías implementadas para la determinación de glucosa, creatinina y lactato deshidrogenasa (LDH). Sobre las metodologías para la valoración de los mismos se realizaron los ensayos correspondientes a la verificación de precisión, exactitud, linealidad y límite de detección. En todos los ensayos realizados se cumplieron con las especificaciones estipuladas por el fabricante para cada analito. Con la aplicación de procedimientos de verificación de métodos se demostró la aceptabilidad de los parámetros analíticos evaluados. La verificación de los métodos permite diseñar y aplicar una estrategia de control calidad interno (CCI) para evaluar la estabilidad analítica de los sistemas de medición en el tiempo, dentro de un marco de seguridad analítica exigido para métodos acreditados.

Cruz et al., (2014), evaluaron el desempeño analítico en la determinación de colesterol total (CT) y triglicéridos (TG) en laboratorios clínicos de la Ciudad de Maracaibo, Venezuela; aplicando una evaluación externa de la calidad (EEC), distribuyeron seis controles comerciales normal (CN) y seis anormal (CA), utilizando equipos automatizados. Para valorar el desempeño se determinó precisión intra e interlaboratorio mediante el coeficiente de variación (CV) y exactitud por medio del cálculo del desvío relativo porcentual (DRP). De los laboratorios evaluados solo el 15,4% para CT y el 46,2% para TG alcanzaron precisión intralaboratorio. La exactitud fue aceptable en CT para el 73,1% y en TG para el 92,1%. Se concluyó que es posible la transferibilidad de resultados entre los laboratorios sobre todo para TG. También se evidenció fallas en el control de calidad interno siendo necesaria la implementación de programas de evaluación externa de la calidad en la región. Esta investigación nos permite observar la situación actual de los laboratorios de algunas regiones del país, destacándose el hecho de la falta de un buen programa de control de calidad que permita asegurar la confiabilidad de los resultados.

Espejo (2016), en el trabajo titulado importancia de la calibración en los laboratorios de química analítica, describe los principales conceptos relacionados con la calidad de los resultados analíticos, la validación de los métodos de medida,

así mismo se explican, en detalle, y se ilustran con ejemplos, los conceptos de calibración instrumental y metodológica y su implementación decisiva en la obtención de resultados de calidad. El objetivo fue resaltar la importancia del proceso de calibración, tanto instrumental como metodológica, en el laboratorio analítico y su relación con la obtención de resultados de calidad. Esta investigación nos ayuda a comprender y clarificar la terminología necesaria para un mejor entendimiento al momento de llevar a cabo el proceso de verificación de nuestros métodos analíticos. Para cualquiera que sea el método se requiere una calibración del instrumento a utilizar, que es el paso inicial en cualquier proceso analítico.

Liendo (2016), en su trabajo de investigación titulado: “Estudios de la exactitud y precisión fotométrica en diferentes laboratorios clínicos privados del Municipio Libertador del Estado Mérida”, establece la importancia de la calibración instrumental, indicando los parámetros instrumentales a estudiar para determinar la exactitud y la precisión fotométrica, para obtener resultados confiables y oportunos en el laboratorio.

Franco, Gil, Ottaviani, Belloni, (2017) en la investigación titulada Evaluación de los límites analíticos de desempeño del laboratorio del HIGA O., en Argentina, hacen mención a los objetivos de este trabajo, como fueron determinar imprecisión (CV) e inexactitud con error sistemático (ES) y error total (ET) de 14 analitos de química clínica en los sectores de planta y de guardia del laboratorio. Se realizó un estudio retrospectivo con el registro de controles de calidad. Respecto del CV, cumple con los criterios el 79% en el sector planta y el 64% en el de guardia. Y en cuanto al ET, cumple el 90% y el 75%, respectivamente. En conclusión, aunque la mayoría de los analitos evaluados cumplen al menos con los criterios mínimos establecidos, los resultados ponen de manifiesto la necesidad de mejorar el desempeño analítico. Detectar los tipos de errores presentes en el proceso de laboratorio es el primer paso para instaurar controles de procedimiento y análisis, soluciones que permitirán mejorar la calidad analítica, uno de los pilares que optimizan la seguridad del paciente.

## BASES TEÓRICAS

### Calidad y normalización en el laboratorio clínico

La palabra **calidad** está presente en los distintos ámbitos de nuestra vida diaria y se ha convertido en un objetivo a lograr para las grandes organizaciones de bienes y servicios, siendo aún más relevante en una entidad de salud como es un laboratorio clínico que juega un papel fundamental como soporte para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, para ello los resultados analíticos deben ser: exactos, precisos, confiables, oportunos y comparables con los de otros laboratorios; un error en los resultados emitidos puede afectar directamente a la salud del paciente, pudiendo ocasionar perjuicios irreparables (Vargas, 2018).

Existen organismos técnicamente competentes, internacionales y nacionales, que tienen como principal propósito promover la calidad de los bienes y servicios que brinda un laboratorio clínico, para ello, estas instituciones desarrollan el proceso de normalización, que consiste en elaborar, emitir y establecer normas (Ochoa, 2008; Fuentes, 2016). Una **norma**, es un documento establecido por consenso entre fabricantes, proveedores de servicios, usuarios y administración, en la que es aprobado por un organismo reconocido que establece, para uso común y repetido, reglas, directrices o características para ciertas actividades o para sus resultados, con el fin de conseguir un grado óptimo de orden y una armonización por parte de los laboratorios (Fuentes, 2016). Todas las normas emitidas, buscan la uniformidad de los resultados, para evitar que diferentes laboratorios que trabajan con la misma muestra, metodología analítica y con personal capacitado, obtengan resultados con una variabilidad muy amplia (Suárez, Arévalo, Linares, Ustáriz y Hernández, 2009).

Para garantizar la calidad y proporcionar confiabilidad en los resultados emitidos, el laboratorio de análisis clínico debe seguir directrices internacionales para la **gestión de la calidad** que desde su publicación en el año de 1987, han obtenido una gran aceptación global como base para el establecimiento de **sistemas de gestión de calidad (SGC)** (Mora, 2016). De esta manera, se puede

definir la calidad como el conjunto de características de un producto o servicio que le confiere la aptitud necesaria para satisfacer e incluso superar las expectativas del cliente o usuario (Ochoa, 2008).

El laboratorio clínico puede responder a distintos modelos y normativas, siendo el más aceptado internacionalmente el de las **normas ISO** (ISO por sus siglas en Inglés, International Organization for Standardization, traducido al español como Organización Internacional de Estandarización) (Carrero y Vásquez, 2017). Dentro de las normas emitidas por la ISO, destacan aquellas normas aplicables para la certificación y acreditación de los laboratorios. Ambas terminologías, son el reconocimiento, ante el cumplimiento de una norma concreta, otorgado por el organismo que emite la norma en cuestión (Ochoa, 2008).

Aunque la certificación y acreditación se utilizan a menudo en forma indistinta, es importante hacer una clara distinción entre ellos; la **certificación** es el procedimiento por el cual un tercero da garantía por escrito de que un producto, proceso o servicio se hace de acuerdo con unos requerimientos. Ese tercero es cualquier entidad “Acreditada ISO” para otorgar certificación, pues garantiza que el laboratorio tiene implantando un SGC que cumple los requisitos de la norma, pero no especifica de manera directa o expresa, el nivel de calidad de los servicios prestados por el laboratorio (Fernández et al., 2005).

La **acreditación** es el procedimiento por el cual un organismo nacional reconoce formalmente que una entidad o persona es competente para llevar a cabo unas funciones específicas. La otorga únicamente una entidad oficial y nacional de calidad, también conocido como **organismo acreditador**, que garantiza la competencia técnica del laboratorio para los servicios que el mismo brinda, la idoneidad y funcionamiento satisfactorio de su SGC (Fernández et al., 2005; Pasquel, 2018).

### **Normalización a nivel internacional**

La ISO, ha emitido normas para la certificación y acreditación de los laboratorios; la norma ISO 9001 es una norma de certificación y las normas ISO 17025 e ISO 15189, son normas de acreditación (Garzón, 2015). En el mes de

septiembre del año 2015 la ISO, publicó la versión más reciente de la norma ISO 9001:2015 “Sistemas de Gestión de la Calidad. Requisitos”, la cual establece una serie de principios para la gestión de la calidad, en la que incluye una orientación al cliente, motivación y la implicación de la alta dirección, el enfoque de procesos y la mejora continua. El uso de la norma ISO 9001:2015 ayuda a asegurar que los clientes obtengan productos y servicios de buena calidad, trayendo como resultado beneficios para el laboratorio (Medina, López y Cárdenas, 2016).

Por otra parte, publicó La norma ISO 17025:2017 “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración”, y la norma ISO 15189-2012 “Laboratorios clínicos: Requisitos particulares para la calidad y competencia”, ambas desarrolladas con el fin de establecer requerimientos para acreditar el sistema de gestión de calidad del laboratorio y así poder obtener reconocimiento formal de la competencia técnica para realizar un ensayo o grupo de ensayos determinados. Es importante resaltar, que en septiembre del 2013 se publicó una actualización de la norma 15189:2013 para los laboratorios (Carrero et al., 2017; Mora, 2016).

En la [Tabla 1](#) se resume lo anteriormente descrito.

**Tabla 1.** Normas emitidas por la ISO para la certificación y acreditación de los laboratorios.

Norma	Aplicación	Abreviatura	Actualización de la norma
<b>ISO 9001: 2015.</b> Sistemas de gestión de la calidad. Requisitos	En cualquier organización certifica que tiene implantado y activado un SGC que cumple los requisitos de la norma	ISO 9001:2015	-
<b>ISO 17025:2017.</b> Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración	Acredita el SGC y la competencia técnica de los laboratorios de ensayos y calibración.	ISO 17025:2017	-
<b>ISO 15189:2012.</b> Laboratorios clínicos: Requisitos particulares para la calidad y competencia.	Acredita el SGC y la competencia técnica de los laboratorios clínicos	ISO 15189:2012	ISO 15189:2013

Fuente: Elaboración propia.

## Normalización a nivel nacional

En Venezuela, el organismo acreditador es el Servicio Autónomo Nacional de Normalización de Calidad, Metrología y Reglamentos Técnicos (SENCAMER) y tiene acreditado un solo laboratorio ([Pasquel, 2018](#)). En Diciembre del año 2016, SENCAMER otorgó el certificado de acreditación para 10 ensayos clínicos específicos al “Laboratorio de Referencia Marrero Blanco, C.A”, primer laboratorio clínico acreditado en el país, bajo la Norma ISO 15189:2012; acreditación válida hasta el 20 de diciembre del año 2019 ([Marrero Blanco C.A, 2018](#)).

El **ente certificador** en nuestro país, es FONDONORMA (Fondo para la Normalización y Certificación de la Calidad), considerada como una asociación civil sin fines de lucro, dirigida a empresas e instituciones que ofrecen servicios hospitalarios, educativos, entre otros, vinculados al cumplimiento de aspectos de seguridad e higiene establecidos en normas vigentes venezolanas e internacionales ([Garzón, 2015](#); [FONDONORMA, 2018](#)). Asimismo, la FECOBIOVE (Federación de Colegios de Bioanalistas de Venezuela), tiene como principal propósito la certificación de los laboratorios clínicos del país. Para el año 2017, certificó dos laboratorios: “Laboratorio de Referencia Marrero Blanco, C.A y Laboratorio Inmuno XXI”, este certificado otorgado tiene validez por un año ([FECOBIOVE, 2018](#)).

Es importante señalar, que la FECOBIOVE ha diseñado estrategias y realizado actividades con el fin de que los laboratorios clínicos en general y los bioanalistas en particular, asuman el reto de la calidad como prioridad. En el año 2007, la Comisión de Calidad y Acreditación de la FECOBIOVE, definió unos requisitos de calidad a cumplir en los laboratorios clínicos de Venezuela, tomando como referencia la norma COVENIN: ISO 15189:2007, en su segunda edición ([FECOBIOVE, 2018](#)).

A la falta de cumplir con todos los requisitos de calidad establecidos en la norma COVENIN: ISO 15189:2007, FECOBIOVE, entre 2007 y 2009, implementó un plan piloto en 5 laboratorios (2 públicos y 3 privados) que culminó con la auditoría y cumplimiento de los requisitos de calidad



seleccionados. El producto de la experiencia de este plan, el análisis y la revisión de sus resultados dió origen a los **Requisitos Mínimos de la Calidad para Laboratorios Clínicos** de la FECOBIOVE a partir del año 2010, cuyo objetivo general es aumentar y estimular la calidad en los laboratorios clínicos de Venezuela mediante el cumplimiento de éstos; concernientes a la organización del laboratorio clínico, recursos humanos, gestión de servicios y suministros externos, procedimientos de: pre-análisis, análisis y registros técnicos de calidad (Ochoa, 2008; FECOBIOVE, 2018).

### **Sistema de gestión de la calidad en el laboratorio clínico**

En los laboratorios clínicos resulta fundamental que tengan establecido un sistema de calidad que cubra toda la gestión del laboratorio abarcando las actividades de las fases pre-analítica, analítica y post-analítica. La implantación de este sistema permitirá la obtención de resultados de calidad, así como lograr el reconocimiento externo de la competencia técnica del laboratorio y lograr la acreditación y certificación del mismo (Ochoa, 2008).

La gestión de calidad, es un campo que hoy en día ha captado la atención e interés por parte de todos quienes hacen salud puesto que este tipo de sistema permite la utilización adecuada de los recursos para la mejor atención de los usuarios y el establecimiento pertinente de un sistema de trabajo que garantice resultados de calidad; por lo que es considerada como el conjunto de actividades necesarias para el control, aseguramiento y mejora de la calidad en el laboratorio clínico (Vargas, 2018). Dicha gestión, exige a empresas y profesionales las siguientes condiciones y acciones: una actitud (disposición moral) y una aptitud (formación profesional) para la mejora permanente de la calidad, una política, metas y organización de la calidad integrada en la gestión de la empresa, planificación de la calidad mediante reglas de funcionamiento escritas, aporte de los recursos humanos y materiales necesarios, compromiso de cumplimiento de esas reglas, compromiso de la mejora permanente y registro de las acciones

desarrolladas para poder rastrear las actividades realizadas en caso de fallos para su corrección (Fernández et al., 2005).

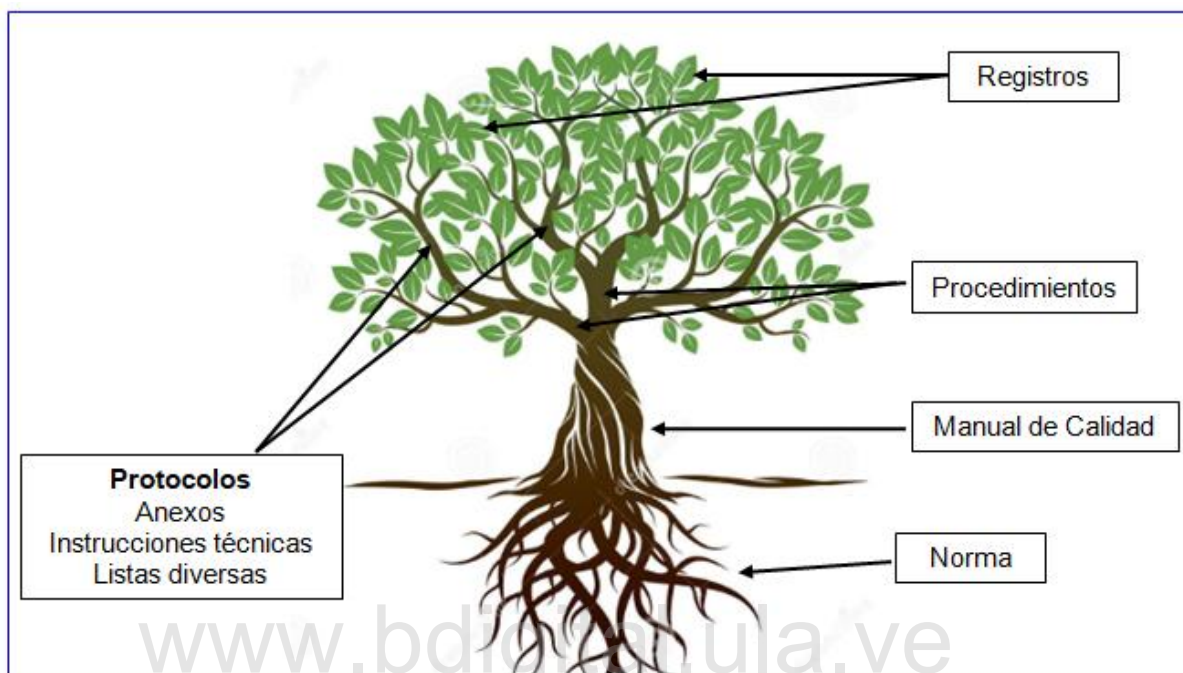
Ese conjunto de requisitos, constituye lo que se conoce con el nombre de sistema de gestión de la calidad (SGC), entendiéndose como la estructura organizativa establecida para regir y actualizar el conjunto de responsabilidades, procesos, acciones y recursos que exige la gestión de la calidad. El SGC comienza por planificar y definir las actividades de la organización, establecer los procesos necesarios para llevar a cabo esas actividades y documentar la manera de realizar los procesos, basándose en **normas de calidad** (Fernández et al., 2005).

Cada una de las actividades realizadas en el laboratorio dará lugar a uno o más procesos y cada proceso a un procedimiento escrito. A la hora de escribir tenemos que elaborar, fundamentalmente, los siguientes tipos de documentos: **manual de calidad**, que es la declaración formal de compromiso con la calidad y los correspondientes planteamientos, directrices y estructura documental del SGC; **procedimientos generales**, relativos a la organización, reglas y funcionamiento del laboratorio; **procedimientos normalizados de trabajo**, que formalizarán los métodos relativos a los procesos analíticos; **procedimientos de calidad** que documentarán los pasos necesarios para mantener y mejorar el SGC y por último **los registros**, usualmente anexos a los procedimientos, donde se recogen los datos de todo lo que se ha hecho (Rojas, 2015).

Las interrelaciones entre la norma, el manual de calidad y el resto de los documentos del SGC quedan bien reflejados en la [Figura 1](#). En efecto la estructura documental de un SGC, por sus interrelaciones, se puede comparar con la de un árbol, en el que:

- La raíz es la norma, de la que parten todos los documentos.
- El tronco es la parte común, el manual de calidad, en donde emanan los distintos procedimientos.
- Las ramas principales son los procedimientos.

- Las secundarias que se entrecruzan son los documentos de procesos más sencillos, en donde se encuentran las instrucciones técnicas, listas, formularios, impresos y los **protocolos**, motivo de esta investigación (Fernández et al., 2005).



**Figura 1.** Arborización de documentos de un SGC. (Fuente: Adoptada de Fernández et al., 2005)

## Protocolos

En la [Figura 1](#) anteriormente señalada, se muestra la estructura documental del SGC, siendo la norma el pilar fundamental o la base de todos los documentos que lo conforman; el manual de calidad, además de determinar y formalizar las reglas de la organización, define y hace una constante referencia a los **procedimientos**, que constituyen el segundo nivel en la jerarquía documental. El conjunto de procedimientos establece y traslada a la práctica, la planificación, el control y la mejora de todos los procesos del laboratorio, que conllevan a elaborar documentos conocidos como **protocolos**. Un protocolo es una serie de instrucciones o pasos a seguir, que establecen cómo se debe actuar para la ejecución de un determinado procedimiento (Fernández, et al., 2005; Brambila, 2009;

Zamora, 2011). Generalmente los elementos que componen los protocolos, son los siguientes:

- a) **Objeto:** Define el propósito o finalidad, es decir el “qué”. Cuál es el proceso por el cual está destinado dicho protocolo.
- b) **Aplicación:** Indica el ámbito de aplicación, es decir, el “para qué”. Cuáles son los límites de aplicación del protocolo, con el objeto de evitar que se use para actividades para las que no está previsto.
- c) **Responsables:** Se refiere a los responsables de todas las actividades relacionadas y de las que ellas se deriven: resultados, recogida de registros, mejora y actualización del mismo.
- d) **Documentos de referencia:** Son los documentos en los que se basa o se relaciona dicho protocolo.
- e) **Descripción:** El procedimiento analítico debe describirse detalladamente en unas instrucciones de uso proporcionadas por la empresa de diagnóstico o elaboradas por el laboratorio, en donde se derivan los siguientes puntos:

**Información previa necesaria:** Debe incluir los instrumentos, reactivos, controles y materiales accesorios necesarios, así como los procesos operativos que se realizan desde que se obtiene la muestra hasta que se obtiene el resultado. También es necesaria la información sobre las muestras a utilizar, riesgos laborales y medioambientales, entre otros.

**Planificación y familiarización:** El proceso debe ser convenientemente planificado, especificando el alcance (prestaciones a estudiar), por lo que debe dedicarse un periodo suficiente de entrenamiento y familiarización con los procedimientos, practicando el manejo y mantenimiento del instrumento, la preparación de muestras y reactivos, la calibración y el diseño de procedimientos de control.

**Procedimientos:** En este apartado deben describirse los procedimientos experimentales a emplear y los requisitos metrológicos establecidos, es decir, los criterios de aceptabilidad a utilizar.

**Informe:** Debe contener los resultados obtenidos para las prestaciones y la evaluación de las mismas, de igual manera debe indicar si el procedimiento cumple los requisitos. Así como, ser aprobado por el personal con la autoridad y conocimientos apropiados para ello (Fernández, et al., 2005; Izquierdo et al., 2014).

### Evaluación de métodos analíticos

Cada analito a cuantificar requiere de un método de análisis, por lo que es fundamental la selección y evaluación de los mismos. La selección tiene como principal objetivo encontrar un método que mejor se adapte a las necesidades y condiciones planteadas por el laboratorio, en el que debe valorarse el material biológico que se utiliza, el volumen requerido de la muestra, el tiempo que consume la ejecución del método, el equipamiento necesario, la posibilidad de su automatización y si el personal que lo va a realizar requiere entrenamiento y medidas de protección especiales (Suardiaz, Cruz y Colina, 2004). De igual manera, la evaluación ha de realizarse para conocer las **características analíticas y de funcionamiento del método** (González, 2010); para una mejor comprensión, es fundamental clasificar los métodos de análisis en base a sus características y usos (Tabla 2).

**Tabla 2.** Clasificación de los métodos analíticos

<b>Métodos</b>	<b>Características</b>	<b>Uso</b>
<b>Definitivo</b>	Métodos que no presentan inexactitud ni imprecisión, por ejemplo: Espectrometría de masa, métodos cromatográficos.	Para asignar valores a los materiales primarios y de referencia.
<b>Referencia</b>	Métodos que presentan inexactitud e imprecisión mínima, por ejemplo: Espectrofotometría de absorción atómica.	Para asignar valores a los métodos de referencia secundarios
<b>Habitual</b>	No se les conoce la inexactitud e imprecisión, por lo que deben ser evaluados, ejemplo: Kits de diagnóstico comercial.	Para asignar valores a las muestras de los pacientes

Fuente: Adoptada de [Suardíaz et al., 2004](#)

### **Características analíticas de los métodos**

También conocido como parámetros de desempeño o parámetros de calidad, son los criterios cuantitativos que se utilizan para decidir si un método es adecuado o no para resolver un determinado problema analítico. Son, por lo tanto, los criterios que se utilizan en la validación de los métodos, así como en la verificación cuando es necesario realizarla. Las características analíticas del método son la materialización o expresión numérica de indicadores de calidad de los métodos, tales como precisión, exactitud, linealidad y rango, límite de detección, límite de cuantificación, entre otros. En la [Tabla 3](#), se recogen algunos parámetros de calidad importantes ([Sierra, Pérez, Gómez y Morante, 2010](#)).

**Tabla 3.** Características analíticas de los métodos

<b>Característica</b>	<b>Parámetro de calidad</b>
<b>Precisión</b>	Desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV).
<b>Exactitud</b>	Error absoluto y error relativo.
<b>Linealidad y rango</b>	Pendiente de la recta de calibrado.
<b>Límite de detección y límite de cuantificación</b>	Límite inferior del intervalo lineal o rango.

Fuente: Adoptada de [Sierra et al., 2010](#).

**Precisión:** Es el grado de concordancia entre los resultados obtenidos cuando un método se aplica, repetidamente y desde el principio, sobre distintas porciones representativas de una misma muestra, por lo que mide el error aleatorio de un método. La precisión puede estimarse de varias formas:

- **Repetibilidad del método:** Grado de concordancia entre los resultados obtenidos cuando el método es aplicable a la misma muestra repetidas veces por un único analista en un tiempo breve.
- **Precisión intermedia:** Grado de concordancia entre los resultados obtenidos cuando el método es aplicable a una misma muestra repetidas veces por un único analista en distintos días.
- **Reproducibilidad:** Grado de concordancia de los resultados obtenidos cuando el método es aplicado a la misma muestra repetidas veces por analistas distintos en laboratorios diferentes y en distintos días ([Sierra et al., 2010](#)).

El estudio de precisión debe hacerse a tres niveles de concentración, por lo general el 80, 100 y 120% de la concentración esperada del analito en la muestra (concentración normal de trabajo), analizando tres porciones representativas de una muestra de cada nivel. Otra forma de evaluar la precisión es analizando por lo menos seis porciones representativas de una muestra a la concentración normal de trabajo ([Sierra et al., 2010](#)).

Para su estimación se utilizan dos parámetros estadísticos, desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV), en la que indican la dispersión de los resultados obtenidos. La S de una muestra de datos de tamaño limitado se expresa con la ecuación (Rodríguez, 2007).

$$S = \sqrt{\frac{\sum(X - \bar{X})^2}{n}}$$

**Ecuación 1.** Expresión que define la desviación estándar (S)

El coeficiente de variación (CV) o desviación estándar relativa, es la expresión porcentual de la S con respecto a la media. Se expresa a continuación (Rodríguez, 2007).

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100\%$$

**Ecuación 2.** Expresión que define el coeficiente de variación (CV)

**Exactitud:** Es la capacidad de dicho método para rendir resultados próximos al valor real o teórico (Sierra et al., 2010). La exactitud mide el error sistemático del método; para su determinación se dispone de dos pruebas sencillas: pruebas de recuperación y pruebas de comparación (Rodríguez, 2007).

• **Pruebas de Recuperación (% de Recuperación):** Se pueden efectuar mediante la prueba de adición y/o prueba de la mezcla

**Prueba de adición de una sustancia añadida:** Consiste en el agregado de cantidades conocidas del analito y medir la concentración del mismo en la muestra antes y después del agregado.

**Prueba de la mezcla:** Como su nombre lo indica, consiste en mezclar en proporciones iguales o diferentes un suero con alta y otro con baja concentración de la sustancia que hay que analizar.

• **Pruebas de comparación:** Este tipo de pruebas pueden ser aplicadas para comparar el método en estudio con uno de referencia (comparación entre métodos) o comparando las concentraciones obtenidas con el método en



estudio sobre una(s) muestra(s) de valor conocido o valor certificado, también conocido como valor teórico ( $\mu$ ), utilizando un material de referencia certificado (MRC), en la que se puede expresar en términos absolutos (error sistemático absoluto,  $E_A$ ), como la diferencia entre el valor medio medido (media de  $n$  resultados obtenidos con el método aplicado a  $n$  alícuotas de la misma muestra) y el valor teórico ( $\mu$ ), o en términos relativos (error sistemático relativo,  $E_r$ ), que indica el porcentaje que representa el  $E_A$ , respecto al valor teórico (Rodríguez, 2007; Sierra et al. 2010).

$$E_A = \text{promedio} - \mu$$

**Ecuación 3.** Expresión que define el error absoluto ( $E_A$ )

$$E_r (\%) = \frac{E_a}{\mu} \times 100\%$$

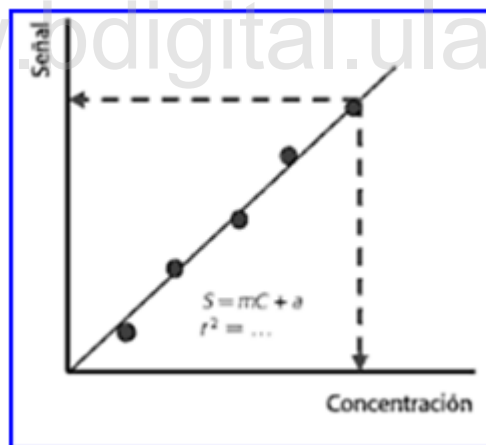
**Ecuación 4.** Expresión que define el error relativo ( $E_r$ )

**Linealidad y rango:** Se puede definir como la capacidad de un método para dar respuestas relacionadas linealmente con la concentración del analito dentro de un determinado intervalo o rango de concentraciones. Existen diversas maneras de comprobar la linealidad de un método; una de éstas es el cálculo del coeficiente de correlación ( $r$ ), en donde se indica que un valor de 1 corresponde a un ajuste perfecto a una línea recta, mientras que un valor de 0 implica que no hay correlación lineal alguna entre las respuestas y las concentraciones. También puede utilizarse el coeficiente de correlación al cuadrado ( $r^2$ ), el cual se conoce como coeficiente de determinación. Un valor de  $r^2$  por encima 0,995 se considera un buen ajuste para la mayoría de los fines. Si el valor de  $r^2$  disminuye lentamente o de repente con el tiempo, entonces algo no funciona correctamente en el mismo (Sierra et al., 2010).

Otra forma mejor de comprobar la linealidad es mediante un gráfico que represente la desviación vertical de los datos experimentales, respecto a los datos calculados con la línea recta obtenida por mínimos cuadrados

( $Y_{\text{experimental}} - Y_{\text{calculada}}$ ). Si las desviaciones verticales son sistemáticamente positivas o negativas en determinadas regiones, entonces quizás los datos experimentales se ajusten mejor a una curva en vez de una recta (Sierra et al., 2010).

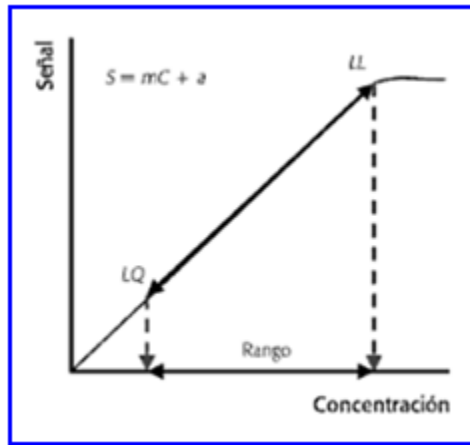
La linealidad de un método se determina analizando con el método en cuestión como mínimo cinco disoluciones estándar con una concentración creciente y conocida del analito (que abarquen el intervalo entre 80-120% de la concentración esperada de analito en la muestra. También se debe preparar y medir el blanco. Se representa gráficamente la respuesta obtenida para cada disolución (S), en el eje de las y, frente a su concentración (C) en el eje de las x. Calculamos estadísticamente mediante análisis de regresión, utilizando el método de los mínimos cuadrados, la pendiente (m) y la ordenada en el origen (a) de la “mejor línea recta” que pase a través de los puntos ( $S = mC + a$ ) y el valor de  $r^2$  (Sierra et al., 2010).



**Figura 2.** Comprobación de la linealidad del método mediante el coeficiente de correlación de la recta de calibrado. (Fuente: Adoptada de Sierra et al., 2010)

El rango o intervalo lineal, es el intervalo de concentraciones útil para un método analítico en el que la pendiente de la recta obtenida se mantiene constante. Dicho intervalo se extiende desde la concentración más pequeña de analito (límite de cuantificación, LQ) hasta la concentración en la que la

curva de calibrado se desvía de la linealidad (límite de linealidad, LL) (Sierra et al., 2010).



**Figura 3.** Intervalo lineal o rango. (Fuente: Adoptada de Sierra et al., 2010)

**Límite de detección y límite de cuantificación:** El límite de detección (LD), es la concentración mínima de analito que proporciona una señal en el instrumento que difiere significativamente de la señal del blanco. Una forma de calcular el LD, para un nivel de confianza del 95%, se basa en estimar la mínima señal analítica distinguible ( $S_d$ ) como la señal media del blanco analítico ( $S_m$ ) procedente de al menos 20 medidas más un múltiplo 3 de la desviación estándar del blanco ( $S_{db}$ ):

$$S_d = S_m + 3S_{db}$$

**Ecuación 5.** Expresión que define el LD

A una señal  $S_d$  le corresponde una concentración que es el LD, lo que se consigue sustituyendo en la recta de calibrado. Si la señal del blanco es cero o coincide con el valor de la ordenada en el origen de la recta de calibrado, la expresión para el cálculo del LD quedaría según la ecuación:

$$LD = \frac{3S_{db}}{m}$$

**Ecuación 6.** Expresión para el cálculo del LD.

Para determinar el LD del método, se preparan 20 blancos individuales, cada uno de los cuales se medirá en el instrumento, obteniéndose 20 medidas procedentes de 20 blancos preparados individualmente (Sierra et al., 2010).

El límite de cuantificación (LC), también conocido como límite de determinación, es la concentración mínima de analito que puede cuantificarse con una exactitud y precisión aceptable. El LC puede considerarse como el límite inferior del intervalo lineal o rango. El cálculo se hace a partir de la señal mínima cuantificable ( $S_c$ ) que es la señal media del blanco analítico ( $S_m$ ), procedente de al menos 20 medidas, más un múltiplo 10 de la desviación estándar del blanco ( $S_{db}$ ):

$$S_c = S_m + 10 S_{db}$$

**Ecuación 7.** Expresión que define el LC

A una señal  $S_c$  le corresponde una concentración que es el LC, lo que se consigue sustituyendo en la recta de calibrado. Si la señal del blanco es cero o coincide con el valor de la ordenada en el origen de la recta de calibrado, la expresión para el cálculo del LC quedaría de acuerdo a la ecuación: (Sierra et al., 2010).

$$LC = \frac{10S_{db}}{m}$$

**Ecuación 8.** Expresión para el cálculo del LC

### **Características de funcionamiento de los métodos**

De acuerdo a la guía ISO 15189 y otras normativas, todos los procedimientos de medida deberán ser validados para asegurar, a través de evidencia objetiva que las especificaciones del desempeño de los procedimientos estén relacionadas con el uso deseado del examen. La

validación de un método incluye: linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, sensibilidad, imprecisión e inexactitud. Para aquellos procedimientos que han sido previamente validados, por ejemplo por un productor de reactivos, y que son usados sin modificación por el laboratorio, deberán ser verificados para determinar si el desempeño del método en el laboratorio donde será empleado cumple con lo especificado por el fabricante. La verificación incluye la estimación de la precisión y veracidad (Delgado, 2009).

Para poder realizar la verificación de los métodos se debe contar con analistas competentes, instrumentación calibrada, el medio ambiente e instalaciones apropiadas, materiales de referencia y reactivos necesarios para efectuar el proceso de verificación, por lo que se asume que los fabricantes han realizado extensos estudios de validación, permitiendo de este modo al laboratorio simplemente confirmar las especificaciones de desempeño declaradas por los fabricantes (Delgado, 2009; Westgard, 2014).

## **Validación**

La validación es el proceso que permite establecer y evaluar las características del desempeño y limitaciones de un método, para determinar su idoneidad; así como la identificación de las influencias que pueden cambiar esas características, demostrando que cumplen con las especificaciones requeridas por el cliente (Delgado, 2009).

Las actividades de validación a realizar dependerán del tipo de método seleccionado, los métodos de referencia solo se deberán validar en caso de incorporación de mejoras, ampliaciones, modificaciones o aquellos empleados fuera del alcance previsto, por lo que deben contar con las necesarias garantías de revisión y actualización. Este tipo de métodos no requieren de una validación completa, sin embargo, el laboratorio cuando adopta un método de referencia sin ninguna modificación, debe verificar las características de funcionamiento del método en su propia situación, antes de ser utilizado para los análisis de las muestras de pacientes (Espejo, 2016; ENAC, 2017). Por lo contrario, los métodos habituales desarrollados por el propio laboratorio, requieren de una validación

completa; nuevamente el laboratorio debe asumir un mayor nivel de profundidad, ya que no existen estudios documentados sobre la validación del procedimiento de examen ([Westgard, 2014](#)).

### **Verificación**

La verificación se puede definir como la confirmación a través de evidencias objetivas, que el método cumple con los requerimientos especificados para el uso previsto. Para ello, el laboratorio solamente necesita conocer las especificaciones de desempeño del método a partir de los datos de validación que se reportan. Muchas veces, estas especificaciones no pueden reproducirse en el laboratorio de rutina, ya que hay una variabilidad intrínseca que depende del equipo, del operador, de las condiciones de trabajo, y también de los protocolos de validación del método, empleados por el fabricante para el establecimiento de dichas metas ([Barwick et al., 2016](#); [CENAM, 2008](#)). Para verificar el correcto rendimiento de un método, se obtienen datos del desempeño del sistema de medición en las condiciones de trabajo del laboratorio; luego éstos son cotejados con las especificaciones brindadas por el fabricante del kits reactivo ([Guglielmo et al., 2011](#)).

### **Calibración Instrumental**

Antes de realizar la validación y/o verificación del método en la rutina del laboratorio, es necesario llevar a cabo la calibración instrumental, ya que es el paso inicial en cualquier proceso analítico; que consiste en la comprobación del funcionamiento correcto del instrumento a utilizar, es decir, en evaluar la idoneidad del mismo, con el objetivo de corregir la respuesta instrumental, evitando obtener resultados erróneos ([Espejo, 2016](#); [Boquet et al., 1994](#)). Para tal fin, se debe medir varias muestras de valores distintos conocidos y exactos y compararlos contra patrones externos universalmente aceptados. Para poder calibrar son necesarios

los estándares o calibradores, estas son sustancias de referencia, en la que se conoce su valor y es considerado exacto ([San Román, 2009](#)).

El espectrofotómetro, es el instrumento de medida más utilizado, por lo que constituye una herramienta fundamental en el laboratorio clínico. Más del 90% de las determinaciones que se realizan en Química Clínica tienen como paso final la lectura de una absorbancia o una transmitancia. El correcto desempeño de los espectrofotómetros es entonces determinante, en la calidad analítica de los resultados que emite el laboratorio ([Duymovich, Acheme, Sesini y Mazziotta, 2005](#)). Es por ello, que cada instrumento debe ser calibrado por personal competente o por personal especialista del proveedor o fabricante del equipo. El laboratorio deberá verificar el estado de calibración con sus patrones de referencia internos trazables a patrones nacionales o a materiales de referencia certificados ([Delgado, 2009](#)).

### **Espectrofotometría de Absorción Molecular**

Es una técnica espectrofotométrica alternativa, actualmente utilizada para la cuantificación de sodio; se fundamenta en lo siguiente: Las radiaciones electromagnéticas tienen distintas acciones sobre la materia, para que se produzcan estos fenómenos es necesario la absorción de cierta energía, es decir, que se encarga de medir a una determinada longitud de onda la cantidad de energía electromagnética absorbida por la sustancia, esta energía es proporcional a la cantidad de átomos o moléculas presentes en el paso de la radiación electromagnética. Así mismo, se basa en la medición de la transmitancia y absorbancia de soluciones que están en celdas transparentes ([Alvarado y Peñaloza 2006](#); [Arévalo, Becerra y Araujo, 1987](#)).

Esta técnica obedece a una ley, conocida como Ley de Lambert-Beer o Ley Combinada, en la que fue descubierta de formas diferentes e independientes en primer lugar por el matemático y astrónomo francés Pierre Bouguer en 1729. Luego por el filósofo y matemático alemán, Johann Heinrich Lambert en 1760 y

por último el físico y matemático también alemán, August Beer en el año 1852 (Skoog, Holler y Crouch, 2008). Esta ley se trata de una ecuación matemática que relaciona la absorción de la luz, con las propiedades del material que es atravesado por una onda electromagnética de longitud de onda definida; en la que estipula lo siguiente “la cantidad de energía electromagnética absorbida por una muestra y por unidad de tiempo es proporcional al producto del espesor de la celda por la concentración de la muestra”. Indica que la concentración de la sustancia es directamente proporcional a la cantidad de luz absorbida o inversamente proporcional al logaritmo de luz transmitida (Prego, 2008; Arévalo, et al., 1987). La relación matemática existente entre la energía radiante y la concentración de una solución está indicada por la ecuación:

$$A = a \cdot b \cdot c = \log \frac{100}{\%T} = 2 - \log \% T$$

**Ecuación 7.** Expresión para definir la Ley de Beer

En donde:

A= absorbancia

a=coeficiente de absorción

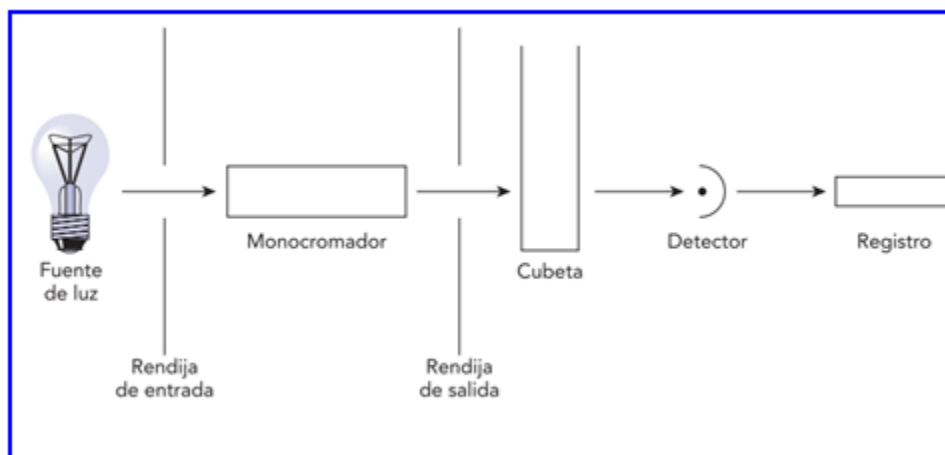
b=espesor de la celda o camino recorrido por la luz a través de la muestra

c=concentración de la sustancia de interés

%T=porcentaje de transmitancia

El espectrofotómetro de absorción molecular, es el instrumento que se utiliza para las medidas de absorción de las radiaciones electromagnéticas. Los principales componentes son los siguientes: fuente de luz, sistema de selección de longitud de onda (monocromador), dispositivo para la cubeta de espécimen, detector de luz, dispositivo de lectura de la señal generada por el detector (González, Arilla, Rodríguez y Sánchez, 1998).





**Figura 4.** Principales componentes de un espectrofotómetro de absorción molecular. (Fuente: Adoptada de [González et al., 1998](#)).

### Sodio en fluidos biológicos

En el laboratorio clínico se cuantifica con frecuencia electrolitos, su determinación se ha convertido en procedimientos de rutina en los laboratorios ([Dubose, 2016](#); [Alvarado et al., 2006](#)). Los electrolitos, son sustancias cargadas eléctricamente con cargas positivas o negativas, capaces de transportar electricidad, cuando se encuentran libres. En el cuerpo humano, los electrolitos se encuentran disueltos en el plasma sanguíneo, sus variaciones provocan movimiento de agua entre los compartimientos donde se encuentran, delimitando una concentración y osmolaridad capaz de mantener un pH óptimo para la función orgánica, manteniendo un equilibrio de los fluidos en las células ([Bustamante, 2013](#)).

Los electrolitos más importantes son aquellos con carga positiva como: el sodio ( $\text{Na}^+$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ), calcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) y magnesio ( $\text{Mg}^{++}$ ); y los iones con carga negativa como: el cloro ( $\text{Cl}^-$ ), bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) y fosfato ( $\text{HPO}_4^-$ ). El de mayor concentración en el líquido extracelular (LEC) es el  $\text{Na}^+$ , pues de su concentración depende el grado de hidratación celular, estableciendo la verdadera presión osmótica de los líquidos intersticiales. Mientras que el  $\text{K}^+$  es el electrolito de mayor

concentración del líquido intracelular (LIC), junto con el  $Mg^{+}$  (Bustamante, 2013; Gómez y Casas, 2014).

El sodio, se considera como el principal electrolito, debido a las funciones que desempeña en el organismo; es un catión indispensable para las reacciones enzimáticas, la conducción nerviosa, el mantenimiento del potencial de membrana celular, contracción y relajación muscular, es por ello, que juega un papel importante y comúnmente controlador de eventos físicos y metabólicos asociados con el ejercicio (Mutis, Pérez, Cardona, Salgado y Ramírez, 2007). El principal aporte de sodio al organismo se realiza a partir del cloruro sódico presente en los alimentos; normalmente, el adulto ingiere entre 5 y 10 g diarios, de los cuales aproximadamente el 70% del sodio corporal total existe en forma libre, de este porcentaje el 97% se encuentra en el LEC y 3% en el LIC. El 30% restante se encuentra en forma fija, no intercambiable en el hueso, cartílago y tejido conectivo (Gómez et al., 2014).

La concentración sérica de sodio, se define por valores comprendidos entre 135-145 mEq/L. En determinadas ocasiones los valores de sodio pueden estar alterados, encontrándose por encima o por debajo de los valores de referencia establecidos, originándose las alteraciones del sodio en las que se encuentran la hiponatremia y la hipernatremia (Gómez et al., 2014).

La hiponatremia es definida como una concentración sérica de sodio menor a 135 mmol/L. Se considera uno de los trastornos electrolíticos más frecuentes en el ámbito de la salud, usualmente producido por la incapacidad de los riñones para excretar la cantidad de líquidos consumidos o por una ingesta excesiva de agua; las dos causas más frecuentes son: la liberación inadecuada de hormona antidiurética (ADH), en la que se produce un exceso de esta hormona en ausencia de una baja osmolaridad que causa reabsorción de agua y la consecuente expansión del fluido extracelular. Gracias a que muchos pacientes presentan un cuadro asintomático la hiponatremia puede ser no diagnosticada ni tratada a tiempo (Castellanos, Cárdenas y Carillo, 2016).

La hipernatremia es el aumento en la concentración de sodio plasmático que excede los 145 mmol/L. Se origina, sobre todo, por la pérdida de agua o por

el aporte excesivo de sodio. Los signos y síntomas neurológicos son más comunes en el adulto. Al inicio, la hipernatremia causa descenso en el contenido de agua cerebral, lo que condiciona la contracción del encéfalo, seguida de una etapa adaptativa entre 1 y 3 días. La corrección debe ser cautelosa, en lo que la rápida disminución en la concentración de sodio plasmático causa un movimiento brusco de agua hacia el cerebro, lo que puede conducir a convulsiones, daño neurológico permanente o muerte. La hipernatremia es común en el paciente hospitalizado como consecuencia iatrogénica, que se considera un factor de riesgo para mortalidad hospitalaria ([Blas y Macedo, 2011](#)).

Es por ello, que el cuerpo humano utiliza mecanismos de regulación que permiten mantener las concentraciones de sodio plasmático, dentro de los valores de referencia establecidos, en donde interviene el sistema nervioso central, específicamente el hipotálamo (sed), como también a nivel periférico, las células en los diversos tejidos y muy especialmente los riñones, que son los encargados de regular su excreción; la hormona aldosterona juega un papel importante, ya que regula intestinal y renalmente la absorción y reabsorción, respectivamente ([Monckeberg, 2012](#); [Restrepo et al., 2010](#)).

### **Métodos para determinar sodio en suero sanguíneo**

Para la determinación de sodio en suero sanguíneo se han empleado técnicas electroquímicas y espectrofotométricas. Los métodos de referencia para este analito son: espectrofotometría de emisión atómica en llama, espectrofotometría de absorción atómica y potenciometría con electrodos selectivos de iones ([Long & Vetter, 2002](#); [Farré et al., 1994](#)). Este último ha adquirido importancia creciente para el análisis de este catión, por las ventajas que brinda, como su rapidez y por mostrar menor grado de sustancias interferentes durante el proceso analítico. En el caso de las técnicas de Espectrofotometría atómica, la mayoría de los laboratorios clínicos no cuentan con los instrumentos y el personal capacitado necesario, a su vez estos instrumentos para su adquisición en el

mercado tienen costos elevados, por consiguiente los laboratorios que los poseen son especializados y de investigación ([Alvarado et al., 2006](#)).

Actualmente, los laboratorios clínicos pueden emplear métodos alternativos, kits de diagnóstico comerciales, basados en espectrofotometría de absorción molecular, que son de fácil adquisición y aplicación a diferencia de los antes mencionados, por lo que son un opción viable para la cuantificación de este catión ([García, Gómez, García y Serna, 2015](#)).

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## Glosario de términos básicos

**Analito:** Componente de un sistema material, y los derivados que pudieran producirse, que pretende ser detectado, identificado o cuantificado mediante la aplicación de un método de análisis químico (Cuadros, Gamiz, Carraco y Ruiz, 2013).

**Blanco analítico** (blanco de método): Muestra que contiene todos los componentes de la matriz excepto el analito y que se somete a todos los pasos del procedimiento analítico (Sierra et al., 2010).

**Cuantificación:** Proceso que consiste en obtener experimentalmente uno o varios valores que puedan atribuirse a un parámetro analítico (Cuadros et al., 2013).

**Instrumento:** Sistema de medida que proporciona información cualitativa o cuantitativa para el analito en la muestra. Es la materialización de una técnica analítica (Sierra et al., 2010).

**Material de Referencia Certificado:** Se caracteriza por pasar por un procedimiento metrológicamente válido para una o más propiedades especificadas, acompañado de un certificado que proporciona el valor de la propiedad especificada, su incertidumbre asociada, y una declaración de la trazabilidad metrológica (Cuadros et al., 2013).

**Método de análisis:** Es una secuencia fija de acciones que se llevan a cabo con objeto de determinar cualitativa o cuantitativamente una especie química en una muestra determinada, para lo cual es necesaria la utilización de una técnica analítica específica (Sierra et al., 2010).

**Muestra:** Porción del material u objeto a estudiar seleccionada de una cantidad mayor (Cuadros et al., 2013).

**Procedimiento analítico:** Son las instrucciones escritas pormenorizadas del método analítico, que indican como analizar una muestra (Sierra et al., 2010).

**Respuesta:** Lectura de un instrumento o sistema de medida como consecuencia de un estímulo dado (Cuadros et al., 2013).

**Señal analítica:** Señal instrumental, que puede ser diferenciada de la señal de fondo y/o de la señal del blanco, y que es utilizada para obtener información analítica (Cuadros et al., 2013).

**Técnica analítica:** Proceso científico fundamental que ha demostrado ser útil para proporcionar información sobre las especies químicas (Sierra et al., 2010).

**Valores de referencia:** Pueden definirse como un juego de valores de una cantidad medida, obtenidos a partir de un grupo de individuos en una situación definida de “salud” (Jensen, López y Mir, 2008; Yofre et al., 2012).

#### **Parámetros de la calibración instrumental:**

- **Exactitud de la longitud de onda:** Es el grado de concordancia entre la longitud de onda que muestra el seleccionador y la longitud de onda de referencia requerida (Duymovich, et al., 2005).
- **Exactitud fotométrica:** Grado de concordancia entre la absorbancia real y la absorbancia medida. El error cometido al leer una absorbancia respecto de una de referencia se denomina entonces “inexactitud fotométrica” (Duymovich, et al., 2005).
- **Precisión fotométrica:** Es la medida de dispersión de una serie de mediciones de absorbancia realizadas en un periodo de tiempo y en las mismas circunstancias (Duymovich, et al., 2005).

- **Luz parasita:** Se refiere a toda radiación electromagnética de longitud de onda distinta a la seleccionada por el monocromador, que alcanza el detector y por lo tanto queda registrada por el instrumento (Duymovich, et al., 2005).
- **Estabilidad fotométrica:** Capacidad del instrumento de mantener constante la absorbancia en función del tiempo. Cuando se producen variaciones constantes y continuas hacia valores superiores o inferiores de absorbancia hablamos de deriva fotométrica y cuando se producen variaciones al azar estamos en presencia de ruido fotométrico (Duymovich, et al., 2005).
- **Linealidad fotométrica:** Capacidad que tiene un instrumento de tener una respuesta lineal y proporcional entre la absorbancia y la concentración, ante una solución de diferentes concentraciones que cumpla la ley de Beer (Duymovich, et al. 2005).

www.bdigital.ula.ve

## CAPÍTULO III

### MARCO METODOLÓGICO

#### Tipo de Investigación

Esta investigación fue de tipo proyectiva, ya que, se propone diseñar un protocolo que facilite la verificación de los parámetros de desempeño (linealidad, precisión y exactitud), contemplados en el inserto del kit de diagnóstico comercial, para la cuantificación de sodio. Cabe destacar, que una investigación proyectiva es aquella que tiene como objetivo diseñar y crear propuestas dirigidas a resolver una determinada situación ([Hurtado, 2010](#)).

#### Diseño de la Investigación

El diseño se basa en un estudio experimental “in vitro”, ya que los ensayos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Universidad de Los Andes; todos éstos aplicados a un kit de diagnóstico comercial para la cuantificación de sodio. [Hurtado \(2010\)](#), considera a este diseño como aquel que constituye aquellas investigaciones, en las que se aborda la problemática a estudiar, directamente en su contexto; el investigador se introduce en el lugar de estudio con el fin de describir, analizar, evaluar y precisar un evento de estudio haciendo uso de los diversos métodos derivados de los paradigmas de la investigación científica.

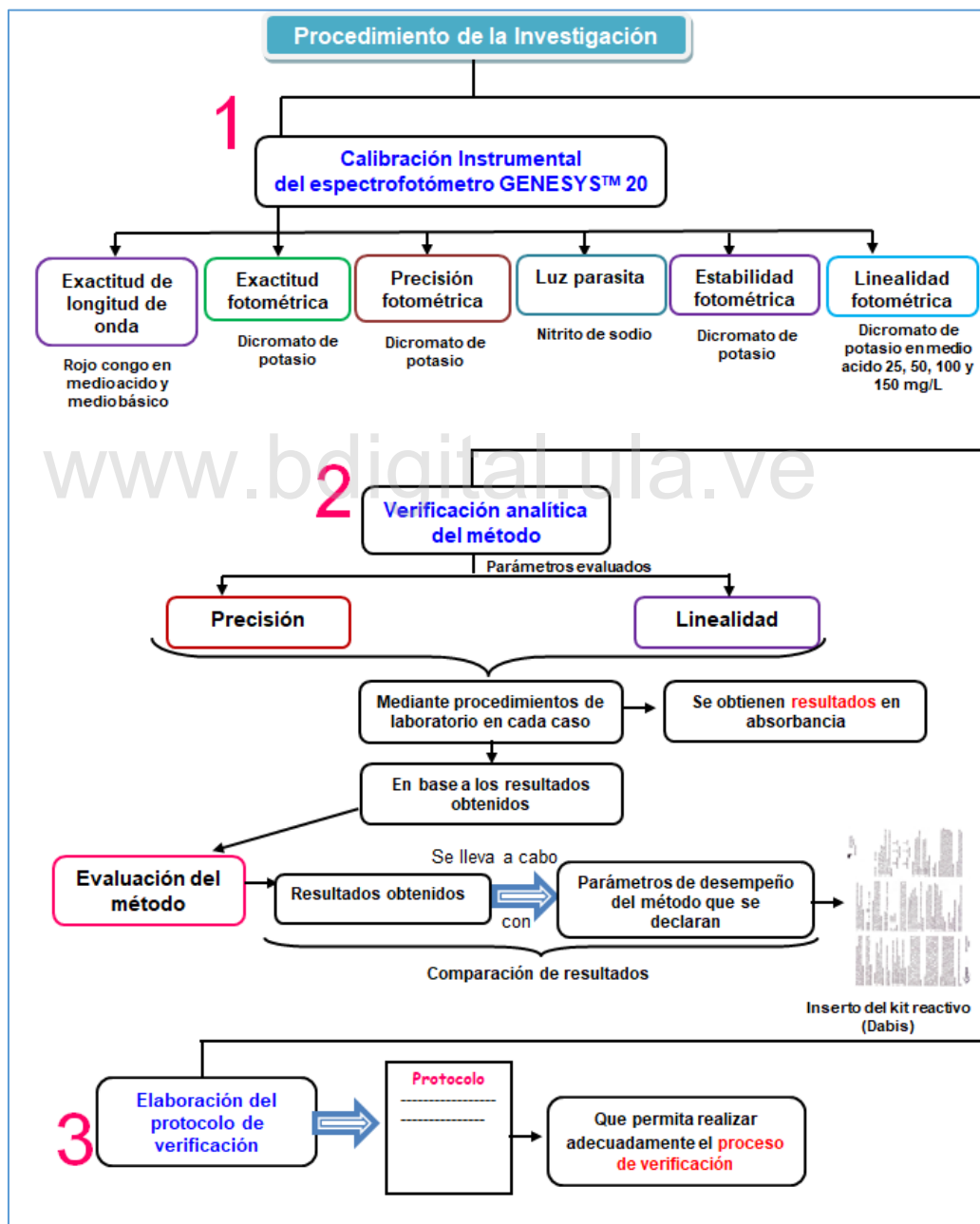
#### Procedimiento de la Investigación

En el [Esquema 1](#), se pueden observar las partes del procedimiento de investigación:

- **Primera parte:** Calibración instrumental del espectrofotómetro a emplear. Antes de realizar la verificación analítica del método es fundamental evaluar el instrumento, para determinar la idoneidad del mismo.



- **Segunda parte:** Verificación analítica del método, donde los parámetros evaluados precisión y linealidad se comparan con las especificaciones de calidad declaradas por el fabricante del kit reactivo.
- **Tercera parte:** Elaboración del protocolo de verificación analítica, en donde se contemplan los procedimientos de verificación para la precisión, linealidad y exactitud.



Esquema 1. Esquema del diseño experimental.

## **Diseño de Análisis**

Una vez recopilado los resultados en absorbancia de cada uno de los ensayos realizados, se procedió a tabular y cuantificar los resultados obtenidos utilizando el programa computarizado Microsoft Excel, posteriormente se hizo un análisis estadístico, hallando el coeficiente de variación (CV) y desviación estándar (S) para el estudio de precisión. Los resultados se presentaron en tablas y gráficas, con su respectiva interpretación con el propósito de visualizar de manera objetiva la realidad de la investigación.

## **Alcances y limitaciones**

El alcance de esta investigación es poder desarrollar e implementar de forma sencilla, protocolos que faciliten la verificación de los parámetros analíticos que se encuentran en los insertos de los kits reactivos, determinando si estos cumplen o no con las especificaciones declaradas por el fabricante del mismo; en primera instancia en el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis y en un futuro próximo en Laboratorios de análisis clínico, proporcionando a los analistas los procedimientos a seguir para llevar a cabo la verificación bajo las condiciones de rutina de su propio laboratorio.

Así mismo, se puede considerar como principal limitante la escasez y el alto costo de los reactivos, que por su imposibilidad de adquirirlos en el mercado se pudo verificar precisión y linealidad como parámetros de desempeño del método.

## METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### Método analítico para determinar sodio en suero (Kit reactivo Dabis)

El método espectrofotométrico para la determinación de sodio en suero, se fundamenta en las modificaciones descritas por primera vez por Maruna y Trinder, en el que el sodio al reaccionar con el exceso de uranilo y magnesio se precipita en forma de sal triple. El exceso de uranio, se hace reaccionar con ferrocianuro (reactivo de color), produciendo un cromóforo cuya absorbancia varía inversamente con la concentración de sodio en la muestra del ensayo, que se mide a una longitud de onda de 550 nm (inserto Dabis).

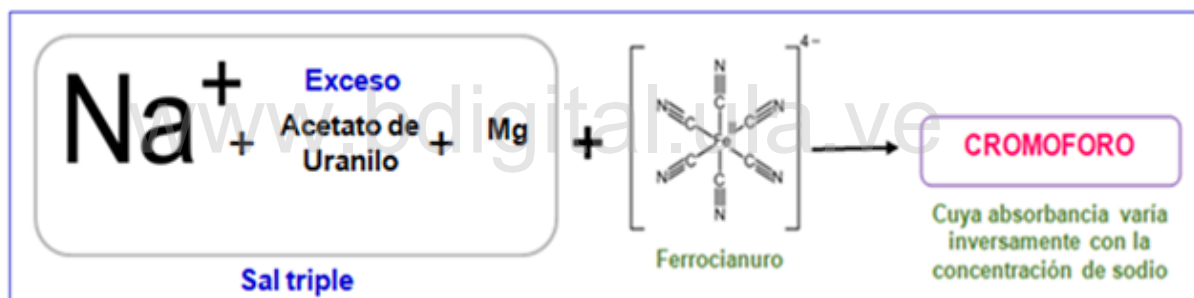


Figura 5. Principio del método espectrofotométrico (Dabis)

### Materiales

- Tubos de ensayo.
- Tubos de microcentrifuga (Eppendorf).
- Gradillas.
- Papel parafilm.
- Papel absorbente.
- Tirro de papel y marcador (rotulación de tubos).
- Cronómetro.

- Celdas de plástico.
- Celdas de cuarzo (lectura a 340 nm, región ultravioleta).
- Pipetas volumétricas (capacidad 1 mL).
- Pipeta volumétrica (capacidad 5 mL).
- Pipeta automática (capacidad de 100  $\mu$ L) con sus puntillas.
- Pipeta automática (capacidad de 1000  $\mu$ L) con sus puntillas.

## **Limpieza del material**

- **Material de vidrio**

Como solución limpiadora se empleó la potasa alcohólica para el lavado de los tubos de ensayo, con el fin, de retirar cualquier tipo de residuos y desengrasar dicho material. Para su elaboración, se procedió a pesar 20 g de hidróxido de potasio (KOH), agregándose en 100 mL de alcohol etílico; posteriormente se depositó dicha sustancia en un frasco ámbar previamente rotulado para evitar la oxidación. El procedimiento de lavado involucra varios pasos, previo a su uso se deben lavar los tubos de ensayo con jabón y agua corriente, luego se le agrega a cada uno de ellos la potasa alcohólica, dejando actuar por unos segundos para que limpie y desengrase correctamente, en seguida se procede a lavar con agua corriente y finalmente se les añade agua destilada para un buen lavado; una vez seco el material, se procedió a guardar en bolsas de plástico con cierre hermético hasta el momento de su uso.

- **Puntillas de plástico**

En un recipiente con solución jabonosa se colocaron las puntillas utilizadas en los diferentes ensayos, donde se dejaron de un día para otro para asegurar la eliminación de los reactivos, al día siguiente se procedió a lavar cada una de ellas con abundante agua corriente y luego con agua destilada; previo a su uso es indispensable asegurarnos que las puntillas estén bien lavadas y secas para evitar contaminación de los reactivos.

- **Celdas de plástico**

Por emplear un reactivo de color en el procedimiento, las celdas utilizadas al momento de realizar las lecturas en el espectrofotómetro, tienden a tomar el color del reactivo utilizado, por lo que interfiere en la lecturas; para evitar dicho inconveniente se colocaron las celdas en un recipiente con etanol diluido hasta observar la eliminación de color, inmediatamente se deben lavar con agua corriente, seguido de agua destilada para asegurar una correcta limpieza.

### **Aparatos e instrumento**

- Espectrofotómetro GENESYS™ 20, marca Thermo Scientific (Instrumento de medición).
- Centrifuga.
- Vórtex.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)



**Figuro 6.** Espectrofotómetro GENESYS™ 20, marca Thermo Scientific

## Reactivos

### Reactivos de la calibración instrumental

Los reactivos requeridos para la calibración instrumental fueron donados por el Departamento de Bioanálisis Clínico, Cátedra de Prácticas Profesionales Intermedias de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Escuela de Bioanálisis, son los siguientes:

- Rojo congo 14 mg/L.
- Ácido Clorhídrico (HCL) 2,5 N.
- Hidróxido de sodio (NaOH) 2,5 N.
- Dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ) 25 mg/L
- Dicromato de potasio 50 mg/L.
- Dicromato de potasio 100 mg/L.
- Dicromato de potasio 150 mg/L.
- Nitrito de sodio 50 g/L

### Reactivos del kit diagnóstico de Dabis

La composición de los reactivos para determinar sodio en suero, provistos en el kit diagnóstico de Dabis, es la siguiente:

- Filtrado reactivo: acetato de uranilo 2,1 mM y acetato de magnesio 20 mM en alcohol etílico.
- Reactivo ácido: ácido acético diluido.
- Reactivo de color para sodio: ferrocianuro de potasio, estabilizadores no reactivos y materiales de relleno.
- Estándar de sodio: solución de cloruro sódico de 150 mEq/L de sodio.

### Sueros control

Se empleó un suero control comercial liofilizado para el estudio de precisión.

## Procedimientos experimentales

### Procedimiento de calibración instrumental del espectrofotómetro

Como primera parte se le realizó el control de calidad instrumental al Espectrofotómetro GENESYS™ 20, marca Thermo Scientific, instrumento empleado para esta investigación, perteneciente al laboratorio de análisis instrumental de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Los parámetros evaluados fueron:

- **Exactitud de la longitud de onda.** Se evaluó usando el método de la determinación del punto isobéptico (PI) con rojo congo en medio ácido y en medio básico. Para ello, se utilizó como reactivos requeridos la solución de rojo congo 14 mg/L, HCl 2,5 N y NaOH 2,5 N.
- **Exactitud fotométrica.** Para su estudio se empleó el dicromato de potasio de 100 mg/L como reactivo, con absorbancia certificada de 1,004.
- **Precisión fotométrica.** Para su evaluación se utilizó una solución de dicromato de potasio de 25 mg/L; es importante mencionar que para la evaluación de dicho parámetro se puede utilizar cualquier solución, ya que no es necesario conocer el valor de la absorbancia, solo se necesita que la absorbancia de la solución permanezca estable en el tiempo.
- **Luz parasita.** Se basó en la medida del porcentaje de transmitancia de una solución de nitrito de sodio 50 g/L. Esta sustancia tiene la propiedad de que sus soluciones absorben toda la radiación incidente de longitudes de onda menores a los 390 nm, por lo que se le denomina ópticamente opaca a la luz. Por lo tanto, la transmitancia a 340 nm de esta solución debe ser igual a cero, y toda aquella que sea detectada corresponde a luz parásita.

- **Estabilidad fotométrica.** Se evaluó mediante el uso de una solución de dicromato de potasio 50 mg/L.
- **Linealidad fotométrica.** Se evaluó usando soluciones de dicromato de potasio de diferentes concentraciones, 25, 50, 100 y 150 mg/L, con absorbancias certificadas de 0,251, 0,502, 1,004 y 1,506, respectivamente.

### Procedimiento analítico del kit reactivo de sodio (marca Dabis)

- **Preparación del filtrado (tratamiento de la muestra).**

**Tabla 4.** Procedimiento analítico del kit reactivo de sodio (marca Dabis)

	Blanco	Estándar	Control	Paciente
<b>Filtrado reactivo</b>	1000 µL	1000 µL	1000 µL	1000 µL
<b>Agua Destilada</b>	50 µL	—	—	—
<b>Estándar</b>	—	50 µL	—	—
<b>Suero Control</b>	—	—	50 µL	—
<b>Suero del paciente</b>	—	—	—	50 µL

Mezclar con el vórtex vigorosamente por 3 min.

Centrifugar a 1.500 rpm por 10 min (los sobrenadantes obtenidos, se agregan a cada tubo correspondiente)

- **Desarrollo del Color**

	Blanco	Estándar	Control	Paciente
<b>Reactivo ácido</b>	1000 µL	1000 µL	1000 µL	1000 µL
<b>Blanco</b>	50 µL	—	—	—
<b>Estándar</b>	—	50 µL	—	—
<b>Suero Control</b>	—	—	50 µL	—
<b>Suero del paciente</b>	—	—	—	50 µL
<b>Reactivo de color</b>	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL

Con el espectrofotómetro realizar lecturas a 550 nm.



## Procedimientos de verificación analítica

### Procedimiento de verificación de la precisión

- a) Preparación del material de referencia o suero control con valor certificado; para su evaluación se empleó un suero control comercial liofilizado, teniendo un rango de confiabilidad de 75 a 139 mEq/L para sodio, valor certificado establecido por su método de referencia (electrodo ion selectivo), el procedimiento para la preparación del mismo, es el siguiente:

**Tabla 5.** Procedimiento para la preparación del suero control comercial

- 
- Abrir el vial, retirar lentamente el tapón de goma evitando pérdidas del material liofilizado.
  - Reconstituir con 5 ml de agua destilada
  - Tapar y mezclar suavemente por inversión, evite la formación de espuma. No agitar
  - Dejar disolver unos 20 minutos a temperatura ambiente, mezclando por inversión
  - Antes de usar se debe mezclar por inversión
- 

- b) Una vez reconstituido, para un mayor rendimiento del material, se separa en alícuotas y se disponen en recipientes con cierre hermético (viales eppendorf), conservándose en el refrigerador a una temperatura de 4° C, protegidos de la luz.
- c) La evaluación se debe realizar en tres días para estudiar la precisión intra-corrída e inter-corrída, procesando en cada día seis mediciones del suero control en términos de repetibilidad y precisión intermedia. En este caso, se estudió la precisión intra-corrída e inter-corrída en dos días, debido a la principal limitante antes mencionada.
- d) Realizar las lecturas correspondientes en el espectrofotómetro a cada uno de los ensayos, para obtener las absorbancias.

- e) Calcular el promedio, S, CV% intra-corrída (por día) e inter-corrída (promedio de ambos días).
- f) Comparar los resultados estadísticos obtenidos con las especificaciones de calidad declaradas por el fabricante del kit reactivo.

### Procedimiento de verificación de la linealidad

- a) Se realizaron diluciones para obtener patrones de diferentes concentraciones. A partir del estándar de 150 mEq/L de sodio, disponible en el kit reactivo, se procedió a realizar diluciones para obtener patrones de 30 y 75 mEq/L, respectivamente. Las diluciones se prepararon de la siguiente manera:

**Tabla 6.** Preparación de las diluciones para el estudio de linealidad.

Patrones (mEq/L)	Dilución	Agua Destilada	Estándar 150 mEq/L
30	1:5	1000 µl	200 µl
75	1:2	400 µl	200 µl
150	-	-	-

- b) Se obtuvieron patrones con diferentes concentraciones, en la que se incluyen los siguientes: 30 mEq/L, 75 mEq/L y 150 mEq/L, procesándose por duplicado, tomando en consideración la metodología contemplada en el inserto del kit reactivo de sodio, que consta de dos etapas: preparado filtrado y desarrollo de color (Véase tabla 4).
- c) Se realizaron las lecturas correspondientes en el espectrofotómetro para obtener las absorbancias.
- d) Con el promedio de las absorbancias obtenidas y las concentraciones de cada patrón se construye una curva de calibración en el programa computarizado Excel, en donde se dispone las concentraciones en el eje X y las absorbancias en el eje Y.
- e) Para comprobar la linealidad del método y determinar la relación entre la absorbancia y la concentración se determinó: la ecuación de la recta y se

calcularon los parámetros de la pendiente, el intercepto, el coeficiente de correlación ( $r$ ) de la línea de regresión o curva de calibración, ajustada mediante el método de los mínimos cuadrados.

### **Procedimiento de verificación de la exactitud**

- a) Preparación del material de referencia o suero control con valor certificado; es importante observar que el suero control comercial utilizado tenga un valor diana certificado, para poder realizar los estudios de comparación correspondientes.
- b) Para un mayor rendimiento del material de control, luego de su reconstitución, se separa en alícuotas y se dispone en recipientes con cierre hermético (viales eppendorf), conservándose en el refrigerador a 4<sup>o</sup> C, protegidos de la luz.
- c) Para su evaluación se deben procesar seis sueros controles en términos de repetibilidad, tomando en consideración el procedimiento contemplado en el kit reactivo empleado.
- d) En cada una de las mediciones se deben obtener lecturas en absorbancia.
- e) Mediante la ecuación de la recta obtenida en los estudios de linealidad del método, se transforman las absorbancias de cada una de las determinaciones en concentraciones (mEq/L), para calcular el promedio o la media aritmética de los resultados obtenidos.
- f) Se calcula el error absoluto ( $E_A$ ) ([Véase Ecuación 3](#)), para posteriormente calcular el error relativo ( $E_r$ ), pudiendo evaluar la exactitud del método utilizado ([Véase Ecuación 4](#)).
- g) Los resultados obtenidos, deben ser cotejados con las especificaciones contempladas por el fabricante del kit reactivo para su verificación.

## **CAPÍTULO IV**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **Calibración instrumental del espectrofotómetro GENESYS™ 20**

En la [tabla 7](#), se presentan los parámetros que comprenden la calibración instrumental, tales como: exactitud de la longitud de onda, exactitud fotométrica, precisión fotométrica, luz parasita, estabilidad fotométrica y linealidad fotométrica. Asimismo, se contemplan los límites de aceptabilidad y los resultados para calificar el Espectrofotómetro GENESYS™ 20, instrumento empleado para esta investigación, determinando la idoneidad del mismo.

Con los resultados observados en la [Tabla 7](#) se comprobó que el espectrofotómetro GENESYS™ 20, empleado para el control de calidad instrumental cumple con todos los parámetros evaluados; los resultados obtenidos se encuentran dentro de los límites de aceptabilidad, indicando que dicho instrumento se encuentra en óptimas condiciones para la verificación analítica del método.



#### **Protocolo de calibración instrumental**

Una vez realizada la calibración instrumental del espectrofotómetro GENESYS™ 20 y comprobar que cumple con los requerimientos, se procedió a elaborar el protocolo de calibración instrumental, tomando en cuenta los elementos que constituyen un protocolo, ya especificados anteriormente. En la [Tabla 8](#), se muestra ya elaborado el protocolo de calibración instrumental, en base a la experiencia obtenida con el espectrofotómetro empleado.

**Tabla 7.** Parámetros evaluados en el control de calidad instrumental con sus respectivos resultados.

Parámetros de la calibración instrumental	Límites de aceptabilidad	Resultados	Decisión: Cumple	
			Si	No
Exactitud de la longitud de onda	<b>Corrimiento óptimo:</b> entre +/- 2 nm. <b>Corrimiento Aceptable:</b> Entre +/- 3 nm.	1 nm	✓	
Exactitud fotométrica	<b>Exactitud fotométrica óptima:</b> Error entre +/- 2,0%. <b>Exactitud fotométrica aceptable:</b> Error entre +/- 3,0%	2,1%	✓	
Precisión fotométrica	<b>Precisión óptimo:</b> CV% menor de 0,5%. <b>Precisión aceptable:</b> CV% menor de 1,0%	0,7%	✓	
Luz parasita	<b>T= 0%</b> (No hay luz parasita) <b>Luz parasita óptima:</b> T% menor del 0,5%. <b>Luz parasita aceptable:</b> menor del 1,0%.	0,1%	✓	
Estabilidad fotométrica	<b>Estabilidad óptima:</b> ruido + deriva menor de 0,5%. <b>Estabilidad aceptable:</b> ruido + deriva menor de 1,0%.	0,1%	✓	
Linealidad fotométrica	<b>Pendiente ideal:</b> 1,00 <b>Pendiente óptima:</b> entre 0,98 y 1,02 <b>Pendiente aceptable:</b> entre 0,97 y 1,03	1,00	✓	

**Tabla 8.** Protocolo de calibración instrumental

	<b>Facultad de Farmacia y Bioanálisis</b> <b>Escuela de Bioanálisis</b> <b>Laboratorio de Análisis Instrumental</b>	 UNIVERSIDAD DE LOS ANDES MÉRIDA - VENEZUELA
	<b>PROTOCOLO DE CALIBRACIÓN          INSTRUMENTAL</b>	<b>Fecha: 01/01/2019</b> <b>Área: Análisis          Instrumental</b> <b>Pág: 1 a 2</b>
<b>a) Objeto:</b> Verificar el correcto funcionamiento del espectrofotómetro.		
<b>b) Aplicación:</b> A los parámetros de calibración instrumental: Exactitud de la longitud de onda, exactitud fotométrica, precisión fotométrica, luz parasita, estabilidad fotométrica y linealidad fotométrica.		
<b>c) Responsable de la verificación:</b> Analista encargado del laboratorio.		
<b>d) Documentos de Referencia:</b> Instrucciones técnicas emitidas por el fabricante del espectrofotómetro y manual de control de calidad instrumental: equipos de medición, emitido por el Departamento de Bioanálisis Clínico, Prácticas Profesionales Intermedias, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Farmacia y Bioanálisis.		
<b>e) Descripción</b>		
<b>Información previa necesaria</b>		
<u><b>Instrumento</b></u>		
<b>Instrumento empleado:</b> Espectrofotómetro GENESYS™ 20, marca Thermo Scientific.		
<b>Estado de calibración instrumental:</b>		
<input type="radio"/> De fabrica <input type="radio"/> En el laboratorio por parte del servicio técnico <input checked="" type="radio"/> <b>En el laboratorio por parte del analista</b>		
<u><b>Reactivos</b></u>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rojo congo 14 mg/L.</li> <li>• Ácido Clorhídrico (HCL) 2,5 N.</li> <li>• Hidróxido de sodio (NaOH) 2,5 N.</li> <li>• Dicromato de potasio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) 25 mg/L</li> <li>• Dicromato de potasio 50 mg/L.</li> <li>• Dicromato de potasio 100 mg/L.</li> <li>• Dicromato de potasio 150 mg/L.</li> <li>• Nitrito de sodio 50 g/L</li> </ul>		
<b>Planificación y Familiarización</b>		
<u><b>Duración de la calibración instrumental</b></u>		
	<b>Fecha</b>	
	<b>Inicio</b>	<b>Final</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Exactitud de la longitud de onda</li> </ul>	24/04/2018	24/04/2018
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Exactitud fotométrica</li> </ul>	25/04/2018	25/04/2018
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Precisión fotométrica</li> </ul>	26/04/2018	26/04/2018
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Linealidad fotométrica</li> </ul>	27/04/2018	27/04/2018
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Luz parasita</li> </ul>	30/04/2018	30/04/2018
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estabilidad fotométrica</li> </ul>	30/04/2018	30/04/2018

<b>Procedimientos para la calibración instrumental</b>		
<b>Procedimientos experimentales</b>		
En el <b>Anexo 1</b> , se detallan los procedimientos experimentales de los parámetros de calibración instrumental.		
<b>Limites de aceptabilidad a considerar</b>		
<b>Parámetros de calibración instrumental</b>	<b>Límites de aceptabilidad</b>	
Exactitud de la longitud de onda	<b>Corrimiento óptimo:</b> entre +/- 2 nm. <b>Corrimiento Aceptable:</b> Entre +/- 3 nm.	
Exactitud fotométrica	<b>Exactitud fotométrica óptima:</b> Error entre +/- 2,0%. <b>Exactitud fotométrica aceptable:</b> Error entre +/- 3,0%	
Precisión fotométrica	<b>Precisión óptimo:</b> CV% menor de 0,5%. <b>Precisión aceptable:</b> CV% menor de 1,0%	
Luz parasita	<b>T= 0%</b> (No hay luz parasita) <b>Luz parasita óptima:</b> T% menor del 0,5%. <b>Luz parasita aceptable:</b> menor del 1,0%.	
Estabilidad fotométrica	<b>Estabilidad óptima:</b> ruido + deriva menor de 0,5%. <b>Estabilidad aceptable:</b> ruido + deriva menor de 1,0%.	
Linealidad fotométrica	<b>Pendiente ideal:</b> 1,00 <b>Pendiente óptima:</b> entre 0,98 y 1,02 <b>Pendiente aceptable:</b> entre 0,97 y 1,03	
<b>Informe</b>		
<b>Resultados obtenidos</b>		
<b>Parámetros evaluados de calibración instrumental</b>	<b>Resultado</b>	
Exactitud de la longitud de onda	<b>1 nm</b>	
Exactitud fotométrica	<b>2,1%</b>	
Precisión fotométrica	<b>0,7%</b>	
Luz parasita	<b>0,1%</b>	
Estabilidad fotométrica	<b>0,1%</b>	
Linealidad fotométrica	<b>1,00</b>	
<b>Decisión instrumental</b>		
	<b>Decisión Cumple:</b>	
	<b>Si</b>	<b>No</b>
• Exactitud de la longitud de onda	✓	
• Exactitud fotométrica	✓	
• Precisión fotométrica	✓	
• Luz parasita	✓	
• Estabilidad fotométrica	✓	
• Linealidad fotométrica	✓	
	<b>Decisión estado calibración instrumental:</b>  Idónea para realizar estudios de verificación analítica del método.	

## Estandarización de las condiciones de trabajo del kit reactivo de sodio (Dabis)

Luego de haber desarrollado el protocolo de calibración instrumental, se inició con los estudios de verificación analítica del método, es decir, la verificación de las características analíticas (precisión y linealidad) del kit reactivo de sodio, específicamente de la casa comercial Dabis. Inicialmente se estudió la precisión del método, procesando un blanco, patrón 150 mEq/L, muestra y suero control por triplicado. Cabe destacar, que la muestra empleada fue suero, pero no se consideró como significativa, debido a que solo se dispuso de una muestra, para cumplir con el procedimiento estipulado por el inserto del kit reactivo utilizado, no contando con una población muestral, esto es debido, a que el enfoque de esta investigación va dirigido a estudios netamente analíticos, relacionado con los parámetros de desempeño del método. En la [Tabla 9](#), se muestran las absorbancias obtenidas en el espectrofotómetro GENESYS™ 20 de las mediciones tras la adición del reactivo de color, con sus respectivos promedios, S y CV%.

**Tabla 9.** Absorbancias del blanco, estándar 150 mEq/L, muestra y suero control, con sus respectivos promedios, S y CV% luego del agregado simultáneo del reactivo de color.

Blanco	Absorbancia	Patrón	Absorbancia	Muestra	Absorbancia	Control	Absorbancia
B1	1,642	P1	0,315	M1	0,400	C1	0,464
B2	1,645	P2	0,309	M2	0,385	C2	0,428
B3	1,702	P3	0,300	M3	0,351	C3	0,366
<b>Promedio</b>	1,663		0,308		0,379		0,419
<b>S</b>	0,034		0,008		0,025		0,050
<b>CV%</b>	<b>2,033</b>		<b>2,451</b>		<b>6,630</b>		<b>11,822</b>

Como se observa en la [Tabla 9](#), las absorbancias obtenidas para las soluciones blanco son mayores que las del estándar (150 mEq/L), muestras y controles; esto se debe a que la reacción química para este procedimiento implica la disminución en la absorbancia, a medida que aumenta la concentración de sodio en los patrones, muestras y controles.



Por otra parte, puede observarse la variabilidad en los resultados. La S y CV% de las muestras y sueros control, son mayores que los obtenidos por los del blanco y patrón (150 mEq/L), indicando la obtención de resultados con mayor dispersión, esto es debido a que al momento de agregar el reactivo de color, se adicionó de manera seriada, por lo que los últimos ensayos (muestras y sueros control), tienen mayor tiempo de reacción. En virtud a lo acontecido, se vió en la necesidad de llevar a cabo primeramente la **estandarización del método**, que consiste en buscar las condiciones óptimas necesarias para este método espectrofotométrico en específico, y luego proceder a la verificación analítica del mismo. Para encontrar las mejores condiciones de trabajo se realizaron diversos ensayos por el **método univariado**, que consiste en variar un parámetro a la vez y mantener las demás condiciones constantes, con el fin de obtener una precisión y exactitud adecuadas; para este sistema se realizaron los siguientes estudios:

- **Fijar tiempos exactos de lectura, tras la adición del reactivo de color:** El parámetro variable en este ensayo fue el tiempo, manteniéndose constante el uso del mismo instrumento, material volumétrico (pipetas volumétricas), reactivos y analista.
- **Tratamiento de la muestra:** El procedimiento para llevar a cabo el tratamiento de la muestra fue el parámetro variable para este ensayo, adicionándose dos pasos a los estipulados en el inserto del kit, manteniéndose constante el uso del mismo instrumento, material volumétrico (pipetas automáticas), reactivos y analista.
- **Emplear pipetas volumétricas y automáticas:** El material volumétrico a emplear fue el aspecto variable en este ensayo, manteniéndose constante el uso del mismo instrumento, reactivos y analista.
- **Fijar tiempos exactos de lectura, tras la adición del reactivo de color**

En la [Tabla 10](#), se muestra las absorbancias del blanco, estándar 30 mEq/L, estándar 75 mEq/L, estándar 150 mEq/L, suero control y muestra para cada

intervalo de tiempo (0, 3 y 5 min), indicando el momento exacto de lectura, una vez que se le adiciona el reactivo de color por separado para cada una de las determinaciones. Los ensayos, se llevaron a cabo por duplicado, procesándose cada una de las réplicas por separado; así mismo pueden visualizarse en la siguiente tabla los promedios, CV% y S.

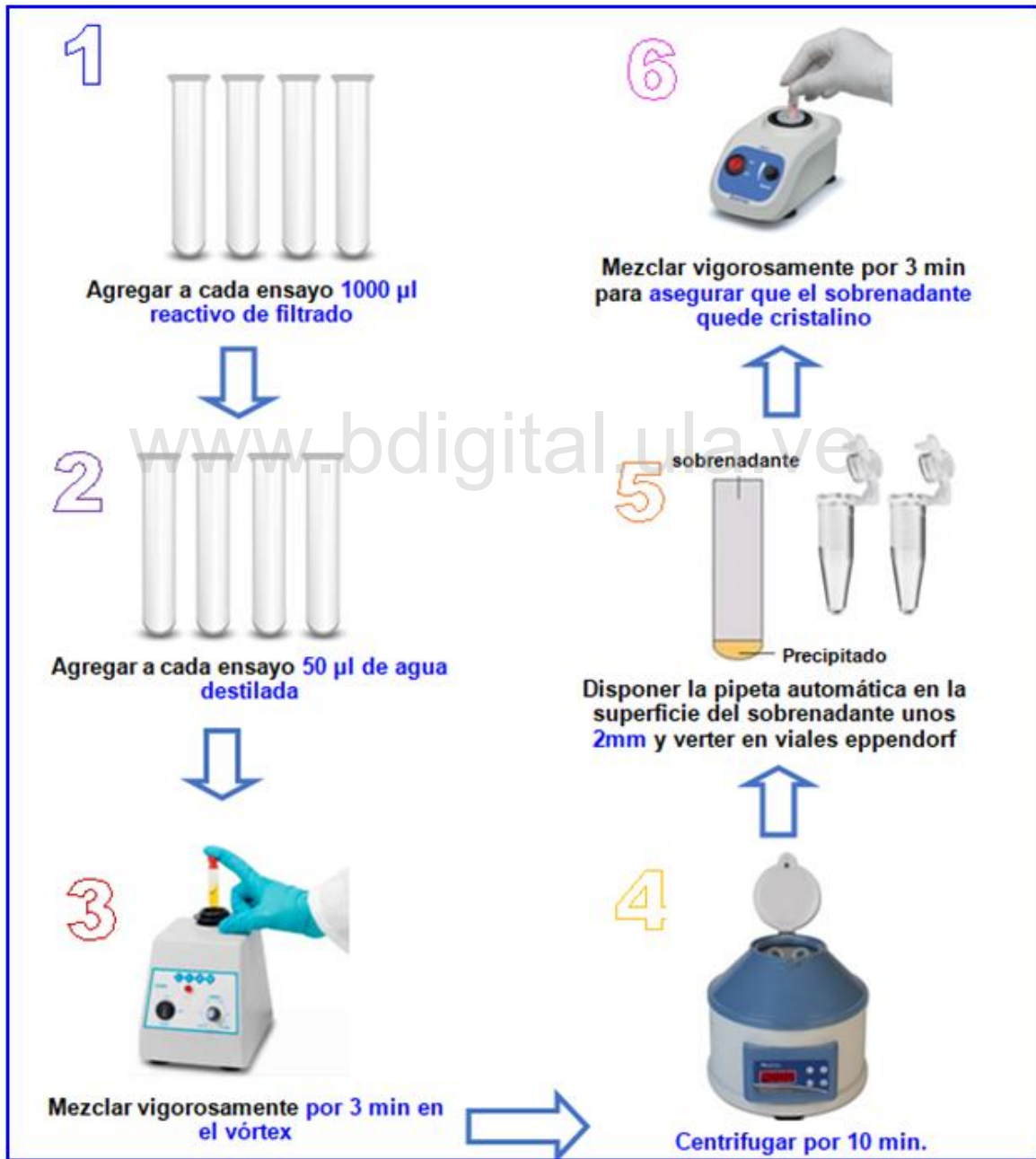
**Tabla 10.** Absorbancias del blanco, estándares (30, 75 y 150 mEq/L), suero control y muestra, con sus respectivos promedios, CV% y S empleando tiempos exactos de lectura.

	Blanco			Estándar 30 mEq/L			Estándar 75 mEq/L		
	0 min	3 min	5 min	0 min	3 min	5 min	0 min	3 min	5 min
<b>1</b>	1,613	1,664	1,676	1,330	1,367	1,380	1,020	1,045	1,056
<b>2</b>	1,620	1,669	1,675	1,331	1,372	1,386	1,028	1,066	1,075
<b>promedio</b>	1,617	1,667	1,676	1,331	1,370	1,383	1,024	1,056	1,066
<b>S</b>	0,005	0,004	0,0007	0,0007	0,003	0,004	0,006	0,015	0,013
<b>CV%</b>	<b>0,306</b>	<b>0,212</b>	<b>0,042</b>	<b>0,053</b>	<b>0,258</b>	<b>0,307</b>	<b>0,552</b>	<b>1,407</b>	<b>1,261</b>
	Estándar 150 mEq/L			Suero Control			Muestra		
	0 min	3 min	5 min	0 min	3 min	5 min	0 min	3 min	5 min
<b>1</b>	0,339	0,358	0,363	0,410	0,434	0,439	0,327	0,349	0,353
<b>2</b>	0,286	0,310	0,316	0,392	0,425	0,431	0,344	0,368	0,371
<b>promedio</b>	0,313	0,334	0,340	0,401	0,430	0,435	0,336	0,359	0,362
<b>S</b>	0,037	0,034	0,033	0,013	0,006	0,006	0,012	0,013	0,013
<b>CV%</b>	<b>11,99</b>	<b>10,16</b>	<b>9,789</b>	<b>3,174</b>	<b>1,482</b>	<b>1,300</b>	<b>3,582</b>	<b>3,748</b>	<b>3,516</b>

El CV% para el blanco, estándar 30 mEq/L, estándar 75 mEq/L, suero control y muestra disminuye, por lo que hay menor dispersión y por ende, menor grado de variabilidad, existiendo una mejoría continua en los resultados obtenidos. Sin embargo, se puede observar que aún existe variabilidad en las determinaciones, dispersión que es posible evidenciar a través de los CV% obtenidos por parte del patrón de 150 mEq/L.

- **Tratamiento de la muestra**

En la [Esquema 2](#), se observa el procedimiento a tomar en consideración para el tratamiento de la muestra; los pasos estipulados en el inserto del kit reactivo son los indicados con los números 1, 2, 3 y 4. Los pasos 5 y 6, son los adicionales para asegurar un correcto tratamiento de la muestra.



**Esquema 2.** Procedimiento para el tratamiento de las muestras.

- **Emplear pipetas volumétricas y automáticas.**

En las [Tablas 11 y 12](#), se muestran las absorbancias del blanco y suero control en intervalos de tiempo (0 y 3 min) con los cálculos estadísticos correspondientes (promedio, S y CV%), para determinar la diferencia entre pipetas volumétricas y automáticas, estableciendo por medio de los resultados obtenidos cuál de estos instrumentos volumétricos es el indicado para emplearlo en los estudios de verificación analítica del método, por lo que se procesaron tres blancos y cuatro sueros control.

**Tabla 11.** Absorbancias del blanco y suero control con sus respectivos cálculos estadísticos empleando pipetas volumétricas

<b>Pipetas Volumétricas</b>					
	<b>Absorbancias</b>			<b>Absorbancias</b>	
<b>Blanco</b>	<b>0 min</b>	<b>3 min</b>	<b>Suero Control</b>	<b>0 min</b>	<b>3 min</b>
<b>B1</b>	1,815	1,856	<b>C1</b>	0,370	0,383
<b>B2</b>	1,668	1,710	<b>C2</b>	0,358	0,373
<b>B3</b>	1,675	1,715	<b>C3</b>	0,338	0,351
			<b>C4</b>	0,415	0,427
<b>Promedio</b>	1,719	1,760	<b>Promedio</b>	0,370	0,384
<b>S</b>	0,083	0,083	<b>S</b>	0,033	0,032
<b>CV%</b>	<b>4,823</b>	<b>4,709</b>	<b>CV%</b>	<b>8,811</b>	<b>8,327</b>

En las [Tablas 11 y 12](#), se comprueba que las pipetas automáticas son más precisas que las pipetas volumétricas, los CV% para el blanco y suero control de las pipetas automáticas son mucho menores que las volumétricas, indicando menor grado de dispersión en los resultados.

**Tabla 12.** Absorbancias del blanco y suero control con sus respectivos cálculos estadísticos empleando pipetas automáticas

<b>Pipetas Automáticas</b>					
	<b>Absorbancias</b>			<b>Absorbancias</b>	
<b>Blanco</b>	<b>0 min</b>	<b>3 min</b>	<b>Suero Control</b>	<b>0 min</b>	<b>3 min</b>
<b>B1</b>	1,655	1,690	<b>C1</b>	0,337	0,348
<b>B2</b>	1,644	1,677	<b>C2</b>	0,317	0,330
<b>B3</b>	1,629	1,664	<b>C3</b>	0,328	0,342
			<b>C4</b>	0,322	0,337
<b>Promedio</b>	1,643	1,677	<b>Promedio</b>	0,326	0,339
<b>S</b>	0,013	0,013	<b>S</b>	0,009	0,008
<b>CV%</b>	<b>0,795</b>	<b>0,775</b>	<b>CV%</b>	<b>2,639</b>	<b>2,250</b>

### Condiciones óptimas del kit reactivo de sodio

Una vez realizado los ensayos con los aspectos a considerar anteriormente, se obtuvieron las condiciones óptimas de trabajo para el kit reactivo de sodio (Dabis). En la [Tabla 13](#), se resume las condiciones óptimas a seguir, para proceder a la verificación analítica del método.

**Tabla 13.** Condiciones óptimas del kit reactivo de sodio (Dabis)

<b>Condiciones óptimas del método</b>	
• Adición del reactivo de color en forma no seriada a cada una de las soluciones	✓
• Emplear un tiempo exacto de lectura, una vez agregado el reactivo de color.	✓
• Procesamiento de las replicas por separado, cuando se dispone de duplicados o triplicados.	✓
• Emplear pipetas automáticas a los procedimientos a ejecutar.	✓
• Realizar un tratamiento de la muestra adecuado como el indicado anteriormente	✓

## Verificación del kit reactivo de sodio

Para verificar las características analíticas del método (precisión y linealidad), es fundamental seguir los siguientes procedimientos:

- **Verificación de la precisión**

En la [Tabla 14](#), se presentan los resultados obtenidos para cada una de las mediciones realizadas en los días 1 y 2, mostrando las concentraciones de sodio (mEq/L) y los parámetros estadísticos correspondientes para su valoración (promedio, S y CV%), determinando la precisión intra-corrída en términos de repetibilidad, tal y como lo refiere Sierra et al. (2010).

**Tabla 14.** Resultados obtenidos del día 1 y 2 para la valoración de la precisión intra-corrída

<b>Precisión intra-corrída</b>			
	<b>Día 1</b>		<b>Día 2</b>
	<b>[Na] (mEq/L)</b>		<b>[Na] (mEq/L)</b>
<b>S1</b>	136,01	<b>S1</b>	136,01
<b>S2</b>	135,27	<b>S2</b>	135,14
<b>S3</b>	136,75	<b>S3</b>	137,12
<b>S4</b>	134,77	<b>S4</b>	135,39
<b>S5</b>	135,14	<b>S5</b>	135,88
<b>S6</b>	136,87	<b>S6</b>	136,87
<b>n</b>	<b>6</b>	<b>n</b>	<b>6</b>
<b>promedio</b>	<b>135,80</b>	<b>promedio</b>	<b>136,07</b>
<b>S</b>	<b>0,880</b>	<b>S</b>	<b>0,789</b>
<b>CV%</b>	<b>0,648</b>	<b>CV%</b>	<b>0,580</b>

Además, se presenta en la [Tabla 15](#), el promedio de los resultados obtenidos en ambos días, mostrándose las concentraciones de sodio (mEq/L), S y CV%, para la valoración de la precisión inter-corrída.

**Tabla 15.** Promedio de ambos días, concentración de sodio (mEq/L), S y CV% para la valoración de la precisión inter-corrída.

<b>Precisión inter-corrída</b>			
<b>Corridas</b>	<b>[Na] (mEq/L)</b>	<b>S</b>	<b>CV%</b>
<b>n=2</b>	<b>135,94</b>	<b>0,835</b>	<b>0,614</b>

Para poder establecer como satisfactoria la verificación realizada en los parámetros precisión intra-corrída e inter-corrída, se debe tomar como criterio de aceptabilidad lo siguiente: La precisión del método obtenida por el laboratorio debe ser menor o igual a la precisión del método que proporciona el fabricante. En caso de que sea mayor, el laboratorio deberá presentar la justificación estadística documentada de que no existe una diferencia significativa, tal y como lo refiere Zamora (2011).

En la [tabla 16](#), se muestran los resultados obtenidos por el laboratorio y se comparan con las especificaciones de calidad declaradas por el fabricante del kit reactivo, verificando en consecuencia estos parámetros de precisión. Al cotejar los resultados, se puede observar en la [Tabla 16](#), lo siguiente: Los CV% y S obtenidos en el laboratorio para precisión intra-corrída e inter-corrída, son inferiores a los que declara el fabricante; indicando que dicho método espectrofotométrico es preciso para la determinación de sodio en suero.

**Tabla 16.** Comparación de los resultados obtenidos con las especificaciones del fabricante del kit, para establecer la verificación de la precisión.

<b>Precisión inter-corrída</b>				
<b>Resultados obtenidos en el laboratorio</b>			<b>Especificaciones declaradas por el fabricante del kit reactivo</b>	
	<b>CV%</b>	<b>S</b>		
<b>Día 1</b>	<b>0,648</b>	<b>0,880</b>	<b>CV% intra-corrída:</b>	<b>3 - 5%</b>
<b>Día 2</b>	<b>0,580</b>	<b>0,789</b>	<b>S intra-corrída:</b>	<b>4 - 7</b>
<b>Precisión inter-corrída</b>				
	<b>CV%</b>	<b>S</b>		
<b>Promedio de ambos días</b>	<b>0,614</b>	<b>0,835</b>	<b>CV% inter-corrída:</b>	<b>4 - 10%</b>
			<b>S inter-corrída:</b>	<b>5 - 14</b>

- **Verificación de la linealidad**

Para establecer la linealidad en que el método cumple la ley de Beer, o el intervalo óptimo de concentraciones (rango), se procedió inicialmente a construir la curva de calibración, para lo cual se prepararon una serie de soluciones patrones con concentraciones de 30, 75 y 150 mEq/L. Estos patrones se calcularon, prepararon y leyeron por duplicado en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm. En la [Tabla 17](#), se visualiza el promedio de las absorbancias correspondientes al blanco y soluciones patrones (30,75 y 150 mEq/L).

**Tabla 17.** Promedio de las absorbancias obtenidas por el blanco y estándares de 30, 75 y 150 mEq/L, para el estudio de la linealidad del método.

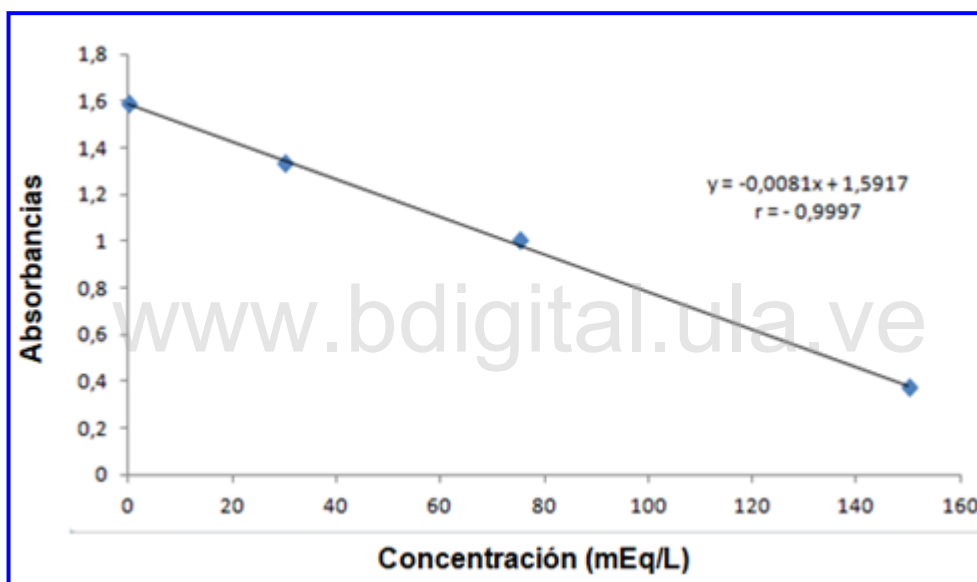
<b>Promedio</b>	
<b>Blanco y Estándares (mEq/L)</b>	<b>Absorbancia</b>
Blanco	1,592
30	1,338
75	1,005
150	0,375

Con los datos obtenidos se realizó la curva de calibración, mediante un análisis de regresión por el método de los mínimos cuadrados, tal como lo refieren Suárez et al., (2009), pudiendo evaluar estadísticamente la regresión lineal del método. En la [Figura 7](#), se muestra la curva de calibración para la determinación de sodio en suero por espectrofotometría de absorción molecular, pudiendo observarse la relación entre las concentraciones (mEq/L) y la respuesta instrumental (absorbancias), viéndose expresada matemáticamente con la ecuación de la recta obtenida por el método de los mínimos cuadrados ( $Y = b.X + a$ ), donde Y es la respuesta del instrumento, b el valor de la pendiente (-0,0081), X es la concentración y a es la ordenada en el origen (1,5917). Para su comprobación estadística, se realizó el cálculo del coeficiente de correlación (r) utilizando el programa computarizado Microsoft Excel, obteniéndose el siguiente resultado:



- Coeficiente de correlación (r): - 0,9997

Cuando el método en estudio tiene una pendiente negativa, como es el caso del kit reactivo (Dabis), lo correcto es reportar sus parámetros estadísticos en negativo, así como sus criterios de aceptabilidad. Dicho método es indirecto ya que no mide directamente al sodio; en este caso lo que se está midiendo es el exceso de uranilo unido al ferrocianuro (reactivo de color), es por ello que es de pendiente negativa. Para una mejor comprensión es importante entender el fundamento del método mencionado anteriormente.



**Figura 7.** Curva de calibración para la determinación de sodio en suero por espectrofotometría de absorción molecular.

Para considerar un buen ajuste lineal del método, el criterio de aceptabilidad establece que el coeficiente de correlación (r) debe ser igual o superior a - 0,9975, tal y como lo refiere Sierra et al. (2010). De manera que, en el intervalo de concentración estudiado entre 0 mEq/L a 150 mEq/L, el método cumple con el requerimiento del coeficiente de correlación estipulado.

En la [Tabla 18](#), se comparan los resultados obtenidos en el laboratorio con los declarados por el fabricante del kit reactivo, para llevar a cabo la verificación de la linealidad del método. Al cotejar los resultados, se pudo observar que la

linealidad declarada por el fabricante es hasta 200 mEq/L. En los estudios realizados en el laboratorio, a pesar de no disponer de soluciones patrones con concentraciones superiores a 200 mEq/L, para corroborar con lo estipulado por el fabricante por falta de reactivo, limitante de esta investigación, se logró evaluar hasta 150 mEq/L (patrón adquirido por el mismo kit). Sin embargo, se obtiene un excelente coeficiente de correlación (r) de - 0,9997, indicando un buen ajuste lineal del método.

**Tabla 18.** Comparación de los resultados obtenidos en el laboratorio con los declarados por el fabricante del kit reactivo, en la verificación analítica de la linealidad



	<b>Resultados declarados por el fabricante del kit reactivo</b>	<b>Resultados obtenidos en el laboratorio</b>
<b>Linealidad</b>	Hasta 200 mEq/L	Hasta 150 mEq/L
<b>Coeficiente de correlación (r)</b>	No lo declara	-0,9997

www.bdigital.ula.ve

## Elaboración del protocolo de verificación analítica

Una vez realizado los diferentes procedimientos para la verificación de las características analíticas del método (precisión, linealidad y exactitud), se procedió a desarrollar el protocolo de verificación. En la [Tabla 19](#), se visualiza la portada y los primeros cuatro elementos que lo constituyen: objeto, aplicación, responsables y documentos de referencia, ya que es indispensable enfocar dicho protocolo al fin que se quiere, mostrándose a continuación lo siguiente:

**Tabla 19.** Portada, objeto, aplicación, responsables y documentos de referencia en el protocolo de verificación analítica del método.

	<p><b>Facultad de Farmacia y Bioanálisis</b>  <b>Escuela de Bioanálisis</b>  <b>Laboratorio de Análisis Instrumental</b></p>	
	<p><b>PROTOCOLO DE VERIFICACIÓN ANALÍTICA</b></p>	<p><b>Fecha: 01/01/2019</b>  <b>Área: Análisis Instrumental</b>  <b>Pág: 1 a 4</b></p>
<p><b>a) Objeto:</b> Verificar las características analíticas del método.</p>		
<p><b>b) Aplicación:</b> A los parámetros básicos de desempeño analítico, específicamente: linealidad, precisión y exactitud.</p>		
<p><b>c) Responsable de la verificación:</b> Analista encargado del laboratorio.</p>		
<p><b>d) Documentos de Referencia:</b> Instrucciones técnicas emitidas por el fabricante del kit reactivo comercial Dabis para sodio.</p>		

En la [Tabla 20](#), se muestra el quinto elemento del protocolo denominado: descripción; como primer punto de este apartado se encuentra la información previa necesaria, en donde se contempla toda la información concerniente al instrumento, el método, la muestra y los reactivos que se requieren para llevar a cabo el proceso de verificación analítica del método.

**Tabla 20.** Información previa necesaria en el protocolo de verificación analítica del método

<b>e) Descripción</b>
<b>Información previa necesaria</b>
<b><u>Instrumento</u></b>
Disponer del protocolo de calibración instrumental.
<b><u>Método</u></b>
<b>Método analítico:</b> Método espectrofotométrico para cuantificar sodio de la casa comercial Dabis.
<b>Fundamento del método:</b> Se basa en las modificaciones descritas por primera vez por Maruna y Trinder, en el que el sodio se precipita en forma de sal triple, acetato de uranilo, magnesio y sodio; con el exceso de uranio, se hace reaccionar con ferrocianuro, produciendo un cromóforo cuya absorbancia varía inversamente con la concentración de sodio en la muestra del ensayo, que se mide a una longitud de onda de 550 nm.
<b>Uso diagnóstico previsto:</b> Detección y seguimiento de hiponatremias e hipernatremias en el individuo.
<b><u>Especimen</u></b>
Sangre
<b><u>Muestra</u></b>
Suero
<b><u>Reactivos</u></b>
Kit de diagnóstico para sodio de la casa comercial Dabis, constituido por los siguientes reactivos: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Filtrado reactivo: acetato de uranilo 2,1 mM y acetato de magnesio 20 mM en alcohol etílico.</li> <li>• Reactivo ácido: ácido acético diluido.</li> <li>• Reactivo de color para sodio: ferrocianuro de potasio, estabilizadores no reactivos y materiales de relleno.</li> <li>• Estándar de sodio: solución de cloruro sódico de 150 mEq/L de sodio.</li> </ul> <p>Para el estudio de precisión:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Se empleó un suero control comercial.</li> </ul>

En la [Tabla 21](#), se observa el según punto a tratar del apartado descripción, denominado planificación y familiarización del método, donde se contemplan las fechas de inicio y finalización de cada actividad realizada en la verificación analítica del método.

**Tabla 21.** Planificación y familiarización del método en el protocolo de verificación analítica

<b>Planificación y Familiarización del método</b>		
<b>Duración de la verificación analítica del método</b>		
	<b>Fecha</b>	
	<b>Inicio</b>	<b>Final</b>
Estandarización del método	02/05/2018	31/05/2018
Verificación de la precisión	01/06/2018	04/06/2018
Verificación de la linealidad	05/06/2018	05/06/2018

En la **Tabla 22**, se visualiza el tercer punto a tratar del apartado descripción, en donde se muestra los procedimientos experimentales a tomar en cuenta para cada parámetro a verificar: precisión, linealidad y exactitud.

**Tabla 22.** Procedimientos experimentales a tomar en consideración para la precisión, linealidad y exactitud en el protocolo de verificación analítica

<b>Procedimientos para la verificación analítica</b>	
<b>Procedimientos experimentales</b>	
<b>Parámetros a verificar:</b>	<b>Procedimientos</b>
<b>PRECISIÓN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Preparación del material de referencia o suero control con valor certificado; para su evaluación se empleó un suero control comercial liofilizado, teniendo un rango de confiabilidad de 75 a 139 mEq/L para sodio, valor certificado establecido por su método de referencia (electrodo ion selectivo).</li> <li>• Una vez reconstituido, para un mayor rendimiento del material, se debe separar en alícuotas y se disponen en recipientes con cierre hermético (viales eppendorf), conservándose en el refrigerador a 4° C, protegidos de la luz.</li> <li>• La evaluación se debe realizar en tres días para estudiar la precisión intra-corrída e inter-corrída, procesando en cada día seis mediciones del suero control en términos de repetibilidad y precisión intermedia. En este caso, la evaluación de la precisión intra-corrída e inter-corrída se realizó en dos días, debido a la principal limitante de esta investigación.</li> <li>• Realizar las lecturas correspondientes en el espectrofotómetro a cada uno de los ensayos, para obtener las absorbancias.</li> <li>• Calcular el promedio, S, CV% intra-corrída (por día) e inter-corrída (promedio de ambos días).</li> <li>• Comparar los resultados estadísticos obtenidos con las especificaciones de calidad declaradas por el fabricante del kit reactivo.</li> </ul>

<p style="text-align: center;"><b>LINEALIDAD</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se realizaron diluciones para obtener patrones de diferentes concentraciones. A partir del estándar de 150 mEq/L de sodio, disponible en el kit reactivo, se procedió a realizar diluciones para obtener patrones de 30 y 75 mEq/L, respectivamente.</li> <li>• Se obtuvieron patrones con diferentes concentraciones, en la que se incluyen los siguientes: 30 mEq/L, 75 mEq/L y 150 mEq/L, procesándose por duplicado, tomando en consideración la metodología contemplada en el inserto del kit reactivo de sodio, que consta de dos etapas: preparado filtrado y desarrollo de color.</li> <li>• Se realizaron las lecturas correspondientes en el espectrofotómetro para obtener las absorbancias.</li> <li>• Con el promedio de las absorbancias obtenidas y las concentraciones de cada patrón se construye una curva de calibración en el programa computarizado Excel, en donde se dispone las concentraciones en el eje X y las absorbancias en el eje Y.</li> <li>• Para comprobar la linealidad del método y determinar la relación entre la absorbancia y la concentración se determinó: la ecuación de la recta y se calcularon los parámetros de la pendiente, el intercepto, el coeficiente de correlación (r) de la línea de regresión o curva de calibración ajustada mediante el método de los mínimos cuadrados.</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>EXACTITUD</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Preparación del material de referencia o suero control con valor certificado; es importante observar que el suero control comercial utilizado tenga un valor diana certificado, para poder realizar los estudios de comparación correspondientes.</li> <li>• Para un mayor rendimiento del material de control, luego de su reconstitución, se debe separar en alícuotas y se dispone en recipientes con cierre hermético (viales eppendorf), conservándose en el refrigerador a 4° C, protegidos de la luz.</li> <li>• Para su evaluación se debe procesar seis sueros controles en términos de repetibilidad, tomando en consideración el procedimiento contemplado en el kit reactivo empleado.</li> <li>• En cada una de las mediciones se obtienen lecturas en absorbancia.</li> <li>• Mediante la ecuación de la recta obtenida en los estudios de linealidad del método, se debe transformar las absorbancias de cada una de las determinaciones en concentraciones (mEq/L), para calcular el promedio o la media aritmética de los resultados obtenidos.</li> <li>• Se calcula el error absoluto (<math>E_A</math>) (Véase Ecuación 3), para posteriormente calcular el error relativo (<math>E_r</math>), pudiendo evaluar la exactitud del método utilizado (Véase Ecuación 4).</li> <li>• Los resultados obtenidos, deben ser cotejados con las especificaciones contempladas por el fabricante del kit reactivo para su verificación.</li> </ul>

En la [Tabla 23](#), se presentan las especificaciones de calidad declaradas por el fabricante del kit, y los criterios a considerar para cotejar los resultados obtenidos en el laboratorio.

**Tabla 23.** Especificaciones de calidad declaradas por el fabricante del kit y criterios de aceptabilidad a considerar en el protocolo de verificación analítica del método.

<b>Especificaciones de calidad declaradas por el fabricante del kit.</b>			
<b>Parámetros de desempeño analítico del método</b>	<b>Especificación</b>	<b>Parámetros estadísticos</b>	
		<b>S</b>	<b>CV%</b>
<b>PRECISION</b>	intra-corrída	4 - 7	3 - 5%
	inter-corrída	5 - 14	4 -10%
		<b>r</b>	
<b>LINEALIDAD</b>	Hasta 200 mEq/L	No lo declara	
<b>EXACTITUD</b>	No la declara		
<b>Criterios de aceptabilidad</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Para poder establecer como satisfactoria la verificación en los parámetros precisión intra-corrída e inter-corrída, se debe tomar en consideración el siguiente criterio de aceptabilidad: La precisión del método obtenida por el laboratorio debe ser menor o igual a la precisión del método que proporciona el fabricante. En caso de que sea mayor, el laboratorio deberá presentar la justificación estadística documentada de que no existe una diferencia significativa, tal como lo refiere Zamora (2011)</li> <li>• Para considerar un buen ajuste lineal del método, el criterio de aceptabilidad establece que el coeficiente de correlación (r) debe ser igual o superior a - 0,9975, tal y como lo refiere Sierra et al. (2010)</li> </ul>			

En la [Tabla 24](#), se muestra el último punto del apartado descripción, denominado informe de verificación, en donde se contempla los resultados obtenidos por el analista de cada uno de los parámetros de desempeño (precisión y linealidad). Además, éstos son comparados con las especificaciones del fabricante para determinar si el método cumple con lo declarado, en las condiciones de rutina del laboratorio.

**Tabla 24.** Informe de verificación analítica, comparación de los resultados obtenidos con las especificaciones del fabricante del kit reactivo

<b>Informe de verificación</b>				
<b>Resultados obtenidos por el analista</b>				
<b>Parámetros de desempeño analítico del método</b>	<b>Especificación</b>		<b>Parámetros estadísticos</b>	
			<b>S</b>	<b>CV%</b>
<b>PRECISION</b>	intra-corrida	Día 1	0,880	0,648
		Día 2	0,789	0,580
	inter-corrida		0,835	0,614
			<b>r</b>	
<b>LINEALIDAD</b>	Hasta 150 mEq/L		-0,9997	
			<b>E<sub>A</sub></b>	<b>E<sub>r</sub></b>
<b>EXACTITUD</b>	No se verificó			
<b>Comparación de resultados</b>				
<b>Decisión analítica del método</b>				
			<b>Decisión: Cumple</b>	
			<b>Si</b>	<b>No</b>
<b>PRECISION</b>			✓	
<b>LINEALIDAD</b>			✓	
<b>EXACTITUD</b>				
<b>Breve valoración</b>				
<p>Los resultados obtenidos de cada uno de los parámetros estudios (precisión y linealidad), cumplen con los criterios de aceptabilidad establecidos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Los CV% y S de la precisión intra-corrida e inter-corrida son inferiores a los declarados por el fabricante del kit reactivo.</li> <li>• El coeficiente de correlación (r) obtenido es superior a - 0,9975, indicando un buen ajuste lineal del método.</li> </ul>				



## Protocolo de verificación analítica

En base al estudio realizado, se puede obtener el protocolo de verificación analítica, herramienta que facilitará la evaluación del desempeño de cualquier método espectrofotométrico comercial que emplean kits de reactivos, mostrándose a continuación lo siguiente:

**Tabla 25.** Protocolo de verificación analítica

	<b>Facultad de Farmacia y Bioanálisis Escuela de Bioanálisis Laboratorio de Análisis Instrumental</b>	 <small>UNIVERSIDAD DE LOS ANDES</small>
	<b>PROTOCOLO DE VERIFICACIÓN ANALÍTICA</b>	<b>Fecha: 01/01/2019 Área: Análisis Instrumental Pág: 1 a 4</b>
<b>a) Objeto:</b>		
<b>b) Aplicación:</b>		
<b>c) Responsable de la verificación:</b>		
<b>d) Documentos de Referencia:</b>		
<b>e) Descripción</b>		
<b>Información previa necesaria</b>		
<b><u>Instrumento</u></b>		
<b><u>Método</u></b>		
<b>Método analítico:</b>		
<b>Fundamento del método:</b>		
<b>Uso diagnóstico previsto:</b>		
<b><u>Especimen</u></b>		
<b><u>Muestra</u></b>		
<b><u>Reactivos</u></b>		

<b>Planificación y Familiarización</b>		
<b><u>Duración de la verificación analítica del método</u></b>		
	<b>Fecha</b>	
	<b>Inicio</b>	<b>Final</b>
<b>Procedimientos para la verificación analítica</b>		
<b><u>Procedimientos experimentales</u></b>		
<b>Parámetros a verificar:</b>	<b>Procedimientos</b>	
<b>PRECISION</b>		
<b>LINEALIDAD</b>		
<b>EXACTITUD</b>		
<b><u>Especificaciones de calidad declaradas por el fabricante del kit.</u></b>		
<b>Parámetros de desempeño analítico del método</b>	<b>Especificación</b>	<b>Parámetros estadísticos</b>
		<b>S</b> <b>CV%</b>
<b>PRECISION</b>		
		<b>r</b>
<b>LINEALIDAD</b>		
		<b>E<sub>A</sub></b> <b>E<sub>r</sub></b>
<b>EXACTITUD</b>		
<b><u>Criterios de aceptabilidad</u></b>		

<b>Informe de Verificación</b>			
<b>Resultados obtenidos por el analista</b>			
<b>Parámetros de desempeño analítico del método</b>	<b>Resultados</b>	<b>Parámetros estadísticos</b>	
		<b>S</b>	<b>CV%</b>
<b>PRECISION</b>			
		<b>r</b>	
<b>LINEALIDAD</b>			
		<b>E<sub>A</sub></b>	<b>E<sub>r</sub></b>
<b>EXACTITUD</b>			
<b>Comparación de resultados</b>			
<b>Decisión analítica del método</b>			
		<b>Decisión: Cumple</b>	
		<b>Si</b>	<b>No</b>
<b>PRECISION</b>			
<b>LINEALIDAD</b>			
<b>EXACTITUD</b>			
<b>Breve valoración</b>			

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Como en todo estudio de investigación, siempre quedan incógnitas relacionadas con el desarrollo del trabajo, que debido a diversos factores, en muchas ocasiones quedan sin ser estudiadas. Dada la importancia del tema, esta investigación servirá como incentivo para que los analistas lleven a cabo la evaluación de sus métodos analíticos a implementar en el laboratorio. En tal sentido, se concluye lo siguiente:

- Se logró la verificación de la precisión y linealidad, demostrando que el método espectrofotométrico utilizado cumple con los requerimientos estipulados, presentando una excelente precisión (intra-corrída e inter-corrída) y una linealidad con un ajuste casi perfecto. La exactitud no pudo ser verificada, por la principal limitante de esta investigación, ya mencionada, y por no disponer de un suero control comercial con un valor diana certificado que permitiera realizar los estudios de comparación correspondientes. Sin embargo, se establece el procedimiento de verificación a tomar en cuenta para la evaluación de la exactitud.
- Con los estudios efectuados de precisión y linealidad, se concluye que el método espectrofotométrico empleado resulta ser una buena alternativa para la determinación de sodio en suero, cuando no se dispone de los métodos de referencia establecidos.
- Se logró la elaboración del protocolo de verificación analítica, herramienta fundamental que facilitará al profesional del bioanálisis poder realizar la evaluación de cualquier método espectrofotométrico a emplear en el laboratorio, antes de ser utilizados para los análisis de muestras de pacientes. Además, la presente investigación proporciona conocimientos generales para la elaboración de protocolos relacionados con otros procedimientos en el laboratorio, que serán de gran ayuda para el analista en su ejercicio profesional.

- El protocolo de verificación elaborado en esta investigación, resulta ser de fácil entendimiento, por lo que cualquier analista debe sentirse en la capacidad de poder realizarlo en su laboratorio. Por otra parte, es menos costoso que otros protocolos establecidos en la literatura, debido a la poca complejidad que posee.

Se presenta a continuación algunas sugerencias que deben ser tomadas en consideración:

- Cuando el laboratorio no dispone de las técnicas de referencia para la cuantificación de analitos, es recomendable que se lleve a cabo la estandarización de los métodos alternativos, en este caso de los métodos espectrofotométricos; los procedimientos estipulados para dichos métodos varían de acuerdo a la casa comercial, por lo que es deber del analista buscar las mejores condiciones de trabajo para ese método en específico y obtener de esta manera resultados que sean reproducibles en el laboratorio.
- Se sugiere para una evaluación completa del método, en próximos trabajos de investigación, adquirir otros sueros controles comerciales con un valor diana certificado, con el fin de poder evaluar la exactitud del mismo.
- Realizar cada uno de los procedimientos de verificación de manera cuidadosa, tomando en cuenta la manera adecuada de pipeteo, el procedimiento correcto para el tratamiento de las muestras, los volúmenes a emplear en cada uno de los ensayos, ya que se verá reflejado en la precisión y exactitud de los resultados obtenidos.
- En la verificación de la precisión, es conveniente realizar el procedimiento estipulado por triplicado, para una mejor evaluación.

## BIBLIOHEMEROGRAFÍA

- Acosta, E., Nunes, G. (2017). Confiabilidad de resultados hematológicos de laboratorios clínicos. *Revista Salus*. Vol. 21 N° 2, 15-16.
- Alvarado, P.; Peñaloza, R. (2006). Determinación de la sensibilidad y especificidad de diferentes métodos para el análisis de sodio y potasio en suero humano. *Cuaderno del Hospital de Clínicas*. Vol. 51-1, pág. 19.
- Arévalo, E.; Becerra, G.; Araujo, J. (1987). *Análisis Instrumental Ciencias de la Salud*. Edición 1, 1984. Mérida-Venezuela. Editorial Textos de la Universidad de Los Andes (ULA).
- Barwick, V.; Morillas, P.; Ellison, S.; Engman, J.; Gjengedal, E.; Oxenboll, U, et al. (2016). *La Adecuación al uso de los métodos analíticos*. Guía Eurachem. Primera Edición Española.
- Blas, V., Macedo, J. (2011). Hipernatremia intrahospitalaria: ¿indicador de calidad en la atención médica? *Medicina interna de México*. Vol. 27, 349-353.
- Boquet, E.; Castillo, M.; Cáceres, A.; Dybkaer, R.; Escutia, V.; Franzini, C. et al. (1994). *Mejoría Continua de la Calidad. Guía para los Laboratorios Clínicos de América Latina*. (1era ed.). Editorial Médica Panamericana. México, D.F. Confederación Latinoamericana de Bioquímica Clínica (COLABIOCLI).
- Brambila, E. (2009). Trazabilidad de las mediciones analíticas. Validación Vs Verificación de los métodos analíticos. *Sociedad Mexicana de Bioquímica*. *Revista Bioquímica*, vol. 34, número 1.
- Bustamante, G. (2013). Electrolitos. *Revista de actualización clínica*, Vol. 39, 2017-2021.
- Camaró, M.; García, R.; Olmos, P.; Catalá, V.; Ocete, M.; Gimeno, C. (noviembre, 2013). Validación y Verificación de los métodos microbiológicos. *Revista Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2015; 33 (7): e31-e36.
- Carrero, L., Vázquez, D. (2017). Sistema de gestión de la calidad para laboratorios clínicos privados de Venezuela bajo la norma internacional ISO 15.189:2012. *Revista Tekhné*. Vol. 20, 24-33.

- Castellano, L., Cárdenas, L., Carillo, M.L. (2016). Hiponatremia. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, 61-69.
- Centro Nacional de Metrología (CENAM). (2008). Guía para la validación en la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico. EMA (Entidad Mexicana de Acreditación), pág. 10.
- Cruz, S.; Bozo, M.; Molero, T.; Zambrano, M.; Panunzio, A. (2014). Desempeño analítico en la determinación de colesterol y triglicéridos en laboratorios clínicos de la ciudad de Maracaibo, Venezuela. Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente, vol. 26, núm. 2, págs. 127-135.
- Cuadros, L., Gamiz, L., Carraco, A., Ruiz, C. (2013). Glosario de Términos analíticos. Primera edición. España. Editorial GRASEQA.
- Delgado, G. (2009). Validación y verificación de métodos de ensayos. Un dilema en los laboratorios de ensayos y en las auditorías de la acreditación. Revista Universitas, volumen 3, número 2-2009.
- Duymovich, C., Acheme, R., Sesini, S., Mazziotta, D. (2005). Espectrofotómetros y fotocolorímetros. Guía práctica de actualización. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, Vol. 39(4), 529-539.
- Entidad Nacional de Acreditación (ENAC). (Mayo, 2017). Laboratorios de ensayos en el ámbito de la sanidad animal: Directrices para la acreditación. México.
- Espejo, M. (2016). Importancia de la calibración en los laboratorios de química analítica. (Tesis de grado). Universidad de Sevilla, Sevilla, España.
- Falcón, Y., Quesada, L., Sosa, O., Fernández, S., Ruiz, Z., García, L. (2014). Estabilidad de un suero control para proteínas totales como controlador bioquímico en los laboratorios clínicos. Universidad de Ciencias Médicas Camaguey, Cuba, 401-414.
- Farré, J., Ribelle, M., Aramburu, J., Criado, A., Peremiquel, M., Ibarz, M. (1994). Evaluación de un método enzimático para la determinación de iones sodio y potasio en suero. Química Clínica, 34-40.

- Federación de Colegios de Bioanalistas de Venezuela (FECOBIOVE). [Versión electrónica]. Recuperado el 13 de julio de 2018 en <https://www.fecobiove.org/certificacion/>.
- Fernández, C.; Mazziotta, D. (2005). Gestión de la Calidad en el Laboratorio Clínico. (1era ed.). Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina. Confederación Latinoamericana de Bioquímica Clínica (COLABIOCLI).
- Fondo para la Normalización y Certificación de la Calidad (FONDONORMA). . [Versión electrónica]. Recuperado el 27 de julio de 2018 en <http://www.fondonorma.org.ve/index.php/es/>.
- Franco, M.; Gil, P.; Ottaviani, M.; Belloni, J. (2017). Evaluación de los límites analíticos de desempeño del laboratorio del HIGA O. Alende de Mar del Plata. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana; 51(1): 115-122.
- Fuentes, X. (2016). La normalización en ciencias de Laboratorio Clínico. Revista del Laboratorio Clínico. 9 (3), 131-143.
- Fuentes, X. (sin fecha). Errores en el laboratorio clínico. Consultor de ciencias de laboratorio clínico, Barcelona.
- Galindo, M.; Sánchez, A. (julio, 2017). Aplicación de metas analíticas y modelo Seis Sigma en la evaluación del control de calidad de Química Clínica. Revista del Laboratorio Clínico. 20-27.
- García, A.; Gómez, A.; García, L.; Serna, M. (mayo 2015). Validación de un método analítico para cuantificar electrolitos séricos por Espectroscopia de Absorción Atómica. Acta Universitaria Multidisciplinary Scientific Journal. Vol. 25 N° 3.
- Garzón, A.C. (2015). Sistemas de gestión en el laboratorio clínico. The journal of the international federation of clinical chemistry and laboratory medicine. Universidad de Bogotá-Colombia.
- Gella, J. (1998). Control de la calidad en el laboratorio clínico. BioSystems, S.A. Barcelona, pág. 39.



- Gil, P.; Franco, M.; Galbán, G. (2016). Evaluación de errores preanalíticos en el laboratorio de planta del HIGA O. Alende de Mar del Plata. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 2016; 50 (3): 463-8.
- Gómez, A.; Casas, M. (2014). *Interpretación Clínica del Laboratorio*. (8va ed.). Editorial Médica Panamericana. Bogotá-Colombia.
- González, J. (2010). *Técnicas y métodos de laboratorio clínico* (3era ed.). Elsevier Masson, Barcelona, España.
- González, J.; Arilla, E.; Rodríguez, M.; Sánchez, A. (1998). *Bioquímica Clínica*. (1era ed.). Editorial Mc Graw Hill Interamericana. Madrid.
- Guglielmone, R.; Elías, E.; Kiener, O.; Collino, C.; Barzón, S. (2011). Verificación de métodos en un laboratorio acreditado y planificación del control de calidad interno. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 2011; 45 (2); 335-47.
- Guillén, Y. (2014). Desempeño analítico en la determinación de hemoglobina glicosilada en laboratorios clínicos participantes del programa de evaluación externa de la calidad de la Universidad de Los Andes. (Tesis de Grado). Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela.
- Izquierdo, S., López, M., Bernabeu, F.A., Boned, B., Canalias, R., Chueca, P... y Serrat, N. (2014). Recomendaciones para la elaboración de documentos relativos a la validación o verificación de los procedimientos analíticos en los laboratorios clínicos. *Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular*, 1-15.
- Jensen, A., López, M., Mir, C. (2008). Intervalos de referencia de sodio y potasio sérico y urinario, en adultos sanos. *Revista Ciencias Tecnológicas*, 3-7.
- Laboratorio Marrero Blanco C.A. [Versión electrónica]. Recuperado el 25 de julio de 2018 en <http://www.laboratoriomarreroblanc.com/institucional/>.
- Liendo, C. (2016). Estudios de la exactitud y precisión fotométrica en diferentes laboratorios clínicos privados del Municipio Libertador del Estado Mérida. (Tesis de Grado). Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela.

- Long, S., Vetter, T. (2002). Determination of sodium in blood serum by inductively coupled plasma mass spectrometry. Analytical Chemistry Division Chemical Science and Technology Laboratory.
- Medina, F.L., López, A.P., Ruiz, C. (2016). Sistemas de gestión ISO 9001-2015: Técnicas y herramientas de Ingeniería de Calidad para su implementación. Revista Ingeniería. Vol. 17(1). 59-61.
- Molero, T.; Zambrano, M.; Cruz, S.; Nuñez, M.; Parra, I.; Panunzio, A, et al. (2013). Parámetros de calidad en Sueros controles utilizados en laboratorios clínicos del estado Zulia, Venezuela. Revista Saber, Universidad de Oriente, vol. 25 N° 4:390-398.
- Monckeberg, F. (2012). La sal es indispensable para la vida ¿pero cuánto? Revista de Chile Nutr. Vol. 39 N° 4, 192-194.
- Mora, J.K. (2016). Analizar la aplicación correcta del apartado 5.4 procedimientos preanalíticos de la norma 15189:2009 en el laboratorio clínico San Luis del Cantón Balzar. (Trabajo de Post Grado). Unidad de Post grado, investigación y desarrollo. Universidad de Guayaquil-Ecuador.
- Mutis, C.A., Pérez, T.E., Cardona, E.R., Salgado, M.R., Ramírez J.A. (2007). Comportamiento de los electrolitos sodio, cloro y potasio pre y post ejercicio en equinos atletas de alto rendimiento en Salto de Bogotá. Revista de medicina veterinaria, 85-91.
- Ochoa, M.A. (2008). Manual de Acreditación y certificación de los laboratorios clínicos. (Trabajo de Grado). Universidad del Zulia, Facultad de Medicina, Odontología y Ciencias Económicas Sociales. Maracaibo-Venezuela.
- Pasquel, M.C. (2018). La acreditación en Latinoamérica con la norma 15189 para los laboratorios clínicos. Revista de Laboratorio Clínico. Vol. (11)1, 1-5.
- Prego, A. (2008). Ley de Lambert-Beer. Recuperado de: <http://materiales.wikispaces.com/file/view/Ley%20de%20LambertBeer.doc/34601047/Ley%20de%20Lambert-Beer.doc>
- Purita, A.; Correa, J.; Salazar, A.; Sáenz, K.; Alva, S.; Campos, E. (2011). ¿Cómo alcanzar una apropiada y adecuada calidad en el laboratorio clínico? Revista BIO RAD Take control, N° 21.

- Quintana, S., Rea, M.G., Barlandas, N.R.E. (2016). Trazabilidad metrológica en los laboratorios clínicos y bancos de sangre acreditados en México. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica*, Vol. 63(4), 214-218.
- Restrepo, C., Restrepo, J.M., Valenzuela, J.T., Mendoza, G., Mutis, C.A., Ramírez, E., Galindo, C.A. (2010). Determinación de los valores fisiológicos del sodio, el potasio y el ion calcio en plasma, con su variación pre y post ejercicio, en caballos de paso fino en la Sabana de Bogotá. *Revista de medicina veterinaria*, 71-74.
- Rodríguez, N. (2007). Aseguramiento de la calidad en los laboratorios de análisis clínico. Mérida, Venezuela: Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Departamento de Análisis Clínico.
- Rojas, A. (2015). Sistema de documentación basado en la norma ISO 15189 para un laboratorio clínico público. (Trabajo de Grado). Universidad Católica Andrés Bello. Caracas-Venezuela.
- San Román, M.C. (2009). Calibración y control de calidad de instrumentos de análisis clínico. Núcleo de Ingeniería biomédica facultades de medicina e ingeniería.
- Sierra, A.I., Pérez, D., Gómez, S., Morante, S. (2010). Términos fundamentales en Análisis Químico. Parámetros de calidad de los métodos analíticos. *Análisis Instrumental*, 4-13.
- Skoog D., Holler, F.J y Crouch, S. (2008). Principios de Análisis Instrumental. Sexta Edición. México: Cengage Learning Editores.
- Suardíaz, J., Cruz, C., Colina, A. (2004). Laboratorio Clínico. La Habana-Cuba: Editorial ciencias médicas.
- Suarez, R; Arévalo, E.; Linares, L.; Ustáriz, F.; Hernández, G. (2009). Validación de un método analítico para la determinación de magnesio eritrocitario. *Avances en química*, vol. 4(2), pág. 53.
- Vargas, J.F. (2018). Manual de Calidad según la norma ISO 15189 para el laboratorio de microbiología del área de salud humana de la Universidad Nacional de Loja (Trabajo de Grado). Universidad Nacional de Loja, Facultad de la Salud Humana, carrera de Laboratorio Clínico. Loja-Ecuador.

- Westgard, J.; Mercapide, L.; Sáez, A.; Porras, O.; Martínez, E.; Brambila, E. (2013). Como garantizar la calidad analítica. Revista Medigraphic. Vol. 57, págs. 180-181.
- Westgard, J.O. (2014). Sistemas de Gestión de la calidad para el Laboratorio Clínico. Edición Wallace Coulter.
- Yofre, P., Fuentealba, S., Torrent, M., Finocchietto, P., Robelli, M., Borquez, F., Loscar, S., Allasia, E. (2012). Intervalos de referencia de determinaciones bioquímicas en el laboratorio central del Hospital de Trelew. Acta bioquímica clínica latinoamericana. Vol. 46(1). 15-22.
- Zamora, A. (2011). Verificación de la imprecisión empleando dos protocolos. Revista Medigraphic, vol. 58, págs. 180-185.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

# **ANEXOS**

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## ANEXO 1. PROCEDIMIENTOS PARA LLEVAR A CABO LA CALIBRACIÓN INSTRUMENTAL

- **Exactitud de la longitud de onda**

**Procedimiento:**

a) Preparación de las formas ácida (A) y alcalina (B) del rojo congo (sol. Certificada). Alicuotar con una misma pipeta 5 mL de solución de rojo congo en dos tubos de ensayo rotulados A y B.

Tubo A: 5 mL de Rojo Congo + 20 µl de HCl 2.5 N.

Tubo B: 5 mL de solución de Rojo Congo + 20 µl de NaOH 2.5 N.

b) Realización del barrido espectrofotométrico de las soluciones A y B entre longitudes de onda de 520 y 570 nm. Se obtienen 14 lecturas en absorbancia para cada una de las longitudes de onda comprendidas entre 520 y 570 nm.

c) Hallar el Punto Isosbético, es decir la longitud de onda en la que la solución presenta la misma absorbancia en su forma ácida y básica.

d) Realizar los cálculos correspondientes y compararlos con los límites de aceptabilidad. Si el punto isosbético hallado difiere del teórico quiere decir que hay un corrimiento de la longitud de onda, para ello se debe calcular la fórmula del corrimiento (nm) en la que se debe tomar en cuenta el PI teórico del rojo congo que es de 541 nm. Se considera aceptable hasta 3 nm.

$$\text{Corrimiento (nm)} = (\text{PI hallado} - \text{PI Teórico})$$

Fórmula para el cálculo del corrimiento (nm)

Corrimiento óptimo	Entre +/- 2 nm
Corrimiento aceptable	Entre +/- 3 nm

Límites de aceptabilidad para la exactitud de la longitud de onda.

- **Exactitud fotométrica**

**Procedimiento:**

- a) Seleccionar la temperatura de trabajo.
- b) Seleccionar la longitud de onda de 340 nm.
- c) Realizar un blanco con agua destilada y medir por duplicado la solución de dicromato de potasio.
- d) Con las absorbancias obtenidas, se debe calcular la media (X) y luego comparar dicho valor con la absorbancia de referencia por medio de la fórmula:

$$\% \text{ Inexactitud fotométrica} = \frac{\text{Abs hallada} - \text{Abs referencia}}{\text{Abs de referencia}} \times 100$$

Fórmula para el cálculo de la inexactitud fotométrica

- e) Comparar el valor obtenido del % Inexactitud fotométrica con los límites de aceptabilidad

Exactitud fotométrica óptima	Error entre +/- 2%
Exactitud fotométrica aceptable	Error entre +/- 3%

Límites de aceptabilidad para la exactitud fotométrica

- **Precisión fotométrica**

**Procedimiento:**

- a) Realizar un blanco con agua destilada y proceder a medir 10 veces la absorbancia de la solución de dicromato de potasio; para ello se debe colocar en una celda la solución y leer la absorbancia a 340 nm. Retirla del portacelda y volver a colocar la celda en la misma orientación, registrando nuevamente el valor de la absorbancia. Repetir el procedimiento hasta obtener 10 medidas.

- b) Una vez obtenido los 10 resultados en absorbancia, se debe calcular la media aritmética (X), la desviación estándar y finalmente obtener el coeficiente de variación porcentual para el estudio de la imprecisión fotométrica

$$CV\% = \frac{DE}{X} \times 100$$

Fórmula para el cálculo de la imprecisión fotométrica.

- c) Comparar el valor obtenido del CV% con los límites de aceptabilidad.

Precisión óptimo	CV% menor de 0.5%
precisión aceptable	CV% menor de 1%

Límites de aceptabilidad para la precisión fotométrica.

- **Luz parasita**

**Procedimiento:**

- a) Ajustar el instrumento a una longitud de onda de 340 nm.  
b) Realizar un blanco con agua destilada.  
c) Medir la solución de nitrito de sodio por duplicado  
d) Si el instrumento permite medir transmitancia, realizar directamente la medición de la transmitancia de la solución ajustando el 100% T con agua destilada, de no ser así debe utilizarse la siguiente fórmula

$$\text{Luz parasita} = \text{TRANSMITANCIA \%} = 10^{(2- \text{absorbancia})}$$

Fórmula para el cálculo de luz parasita

- e) Comparar el valor obtenido del T% con los límites de aceptabilidad.



Luz parasita ideal	T= 0% (No hay luz parásita)
Luz parasita óptima	T% menor del 0.5%
Luz parasita aceptable	Menor del 1%

Límites de aceptabilidad para luz parasita

- **Estabilidad fotométrica**

**Procedimiento:**

- Realizar un blanco con agua destilada.
- Medir la absorbancia de la solución de dicromato. En este momento poner en marcha un cronómetro y registrar la absorbancia cada 30 segundos durante 10 minutos sin variar ninguna condición de la medida. Por lo tanto, al cabo de 10 minutos se tendrán 21 valores.
- Con los valores obtenidos se calcula la media (X) y la desviación estándar (DE)
- Se procede a realizar el cálculo de la deriva, en la cual es un parámetro que se define como la pendiente de la curva de absorbancia vs tiempo y se expresa como porcentaje del valor inicial de absorbancia

$$\text{Deriva} = \frac{(\text{Abs final} - \text{Abs inicial})}{\text{Abs.inicial}} \times 100$$

Fórmula para el cálculo de la deriva fotométrica

- Se continúa con el cálculo del ruido; este parámetro se determina como la dispersión de los valores alrededor del valor medio de absorbancia.

$$\text{Ruido} = \frac{\text{desviación estandar}}{\text{Abs.media}} \times 100$$

Fórmula para el cálculo del ruido fotométrico

- Comparar los resultados obtenidos de deriva + ruido con los límites de aceptabilidad.

Estabilidad óptica	Ruido + deriva menor de 0.5%
Estabilidad aceptable	Ruido + deriva menor de 1%

Límites de aceptabilidad para estabilidad fotométrica.

- **Linealidad fotométrica**

**Procedimiento:**

- Seleccionar la temperatura de trabajo.
- Seleccionar la longitud de onda; se realiza con la misma longitud de onda utilizada para el control de exactitud fotométrica.
- Realizar un blanco con agua destilada y medir por duplicado las absorbancias de las soluciones de dicromato de potasio en concentraciones crecientes.
- Obtener la media aritmética ( $\bar{X}$ ) de cada una de las concentraciones de la solución.
- Graficar las absorbancias promedio halladas (eje y) en función de las absorbancias de referencia (eje x) en el programa computarizado Excel.
- Se realizó el estudio de los mínimos cuadrados de la ecuación obtenida, donde la pendiente representa la linealidad fotométrica.
- El valor de la pendiente obtenida de la ecuación se compara con los límites de aceptabilidad.

Pendiente ideal	1.00
Pendiente óptima	Entre 0.98 y 1.02
Pendiente aceptable	Entre 0.97 y 1.03

Límites de aceptabilidad para linealidad fotométrica



**SODIO**  
(Método Colorimétrico)

**Uso**

Para la determinación colorimétrica de sodio en suero y plasma humanos

**Introducción**

El sodio es el principal catión del fluido extracelular. Desempeña un papel central en el mantenimiento de la distribución normal de agua y la presión osmótica en los diversos compartimentos de fluidos. La principal fuente de sodio en el cuerpo es el cloruro de sodio contenido en los alimentos ingeridos. Sólo alrededor de un tercio del sodio total del cuerpo entero está contenido en "el esqueleto" ya que la mayoría de ellos está contenido en los fluidos extracelulares.<sup>1,7</sup>

La hiponatremia (nivel de sodio bajo en suero) se encuentra en una variedad de condiciones incluyendo las siguientes: poliuria severa, acidosis metabólica, la enfermedad de Addison, diabetes, y la enfermedad tubular renal. Hiper-natremia (aumento del nivel de sodio) se encuentra en las siguientes condiciones: hiperalgemia, deshidratación severa y coma diabético después de la terapia con insulina, el tratamiento con exceso de sales de sodio.<sup>1,7</sup>

**Principio**

El presente método se basa en modificaciones descriptas por primera vez por Manuzá y Trinder en el que el sodio se precipita en forma de la sal triple, acetato de uranio de magnesio y de sodio, con el exceso de uranio a continuación, se hace reaccionar con ferrocianuro, produciendo un cromóforo cuya absorbancia varía inversamente con la concentración de sodio en la muestra del ensayo.

**Composición del Reactivo**

1. **Filtrado:** Reactivo: Acetato de Uranio 2.1 mM y Acetato de Magnesio 20 mM en alcohol etílico.
2. **Reactivo de Ácido:** Un ácido acético diluido.
3. **Reactivo Color de sodio:** Estabilizadores de ferrocianuro de potasio, no reactivos, y materiales de relleno.
4. **Estándar de sodio:** Solución de cloruro sódico: 150 mEq/L de sodio.

**Detenido del Reactivo**

Si se produce turbidez, puede ser una señal de contaminación.

**Advertencia y Precaución**

1. El reactivo es para uso diagnóstico "in vitro". Precaución: No pipetear la solución con la boca. Evitar ingestión / contacto.
2. Las muestras deben ser consideradas infecciosas y manejadas adecuadamente.

**Almacenamiento y Estabilidad**

Almacene todos los reactivos a temperatura ambiente (15-30°C). Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

**Recolección de las Muestras**

Suero recién obtenido es la muestra de elección y se requiere una cantidad 50 µL (0.05 mL). El plasma de anticoagulantes que no contengan sodio (por ejemplo, litio, calcio, magnesio o heparina) es una alternativa

aceptable. El sodio es estable durante al menos 24 horas a temperatura ambiente y 2 semanas en el refrigerador.<sup>1,7</sup>

**Materiales Necesarios Pero No Suministrados**

1. Espectrofotómetro.
2. Centrífuga.
3. Tubos de prueba / gradilla.

**Procedimiento**

- Preparación de filtrado:
1. Identifique los tubos: blanco, estándar, control, paciente, etc.
  2. Pipetear 1.0 mL de reactivo filtrado a todos los tubos.
  3. Añadir 50 µL de muestra a todos los tubos y agua destilada al blanco.
  4. Agitar energicamente todos los tubos y mezclar de forma continua durante 3 minutos.
  5. Centrifugar los tubos a alta velocidad (1,500 G) durante 10 minutos y probar los fluidos sobrenadantes al como se describe a continuación, teniendo cuidado de no perturbar el precipitado de proteína.

**Desarrollo del color**

1. Identifique los tubos de ensayo correspondiente a los tubos Filtrados anteriores.
2. Pipetear 1.0 mL reactivo de ácido a todos los tubos.
3. Añadir 50 µL de sobrenadante a los tubos respectivos y mezclar.
4. Añadir 50 µL de reactivo de color a todos los tubos y mezclar.
5. Cero el espectrofotómetro con agua destilada a 550 nm.
6. Leer y registrar la absorbancia de todos los tubos.

**Nota:** La reacción química de este procedimiento implica una reducción en la absorbancia, en oposición al aumento de absorbancia habitual. La absorbancia del blanco debe ser más alta que la de las muestras de prueba.

**Cálculos**

- Abs. = Absorbancia  
S = Muestra  
STD = Estándar

$$\frac{(\text{Abs. de blanco} - \text{Abs. de S}) \times \text{Conc. de STD (mEq/L)}}{(\text{Abs. de blanco} - \text{Abs. de STD})} = \text{Conc. de S (mEq/L)}$$

**Ejemplos de Cálculos**

Suponga el estándar con un valor de sodio de 150 mEq/L, una absorbancia de 0.803, mientras que la muestra y el blanco tienen absorbancias de 0.880 y 1.406, respectivamente. La concentración de sodio de la muestra puede entonces ser calculada de la siguiente manera:

$$\frac{(1.406 - 0.880) \times 150 = 0.526 \times 150 = 131 \text{ mEq/L}}{(1.406 - 0.803) \quad 0.603}$$

**Limitaciones de Procedimiento**

1. Al preparar filtrados, agitación o centrifugación inadecuada causará pruebas con resultados bajos falljos.
2. Calcio en la sangre, el color y los niveles de potasio de hasta 3 veces lo

**ANEXO 2. INSERTO DEL KIT REACTIVO DE SODIO (Dabis)**

normal al parecer no ejercen influencia negativa sobre el procedimiento, los niveles de sodio superiores a 5 veces el valor normal del mismo modo no presentan problemas.

**Control de Calidad**

Se recomienda que los controles se incluyan en cada serie de ensayos. Material de control comercialmente disponible con los valores establecidos de sodio pueden ser utilizados para el control de calidad. El valor asignado del material de control debe ser confirmado por la aplicación elegida. Si no se obtiene el rango apropiado de valores en el ensayo del material de control puede indicar deterioro del reactivo, mal funcionamiento de instrumentos, o errores de procedimiento.

**Valores Esperados<sup>1,7</sup>**

135-155 mEq/L

**Características de Rendimiento**

1. **Linealidad:** 200 mEq/L.
2. **Sensibilidad:** Basado en un instrumento de resolución de A = 0.001, el presente método tiene una sensibilidad de 0.5 mEq/L.
3. **Comparación:** Una comparación entre este procedimiento y el análisis fotométrico de litina produce una ecuación de regresión de  $y = 0.69x + 4.5$  con un coeficiente de correlación de 0.92.
4. **Estudio de precisión:**

**Entre Corridos**

Promedio (mEq/L)	S.D.	C. V. %
146	7	5
127	4	3

**Corrida-a-Corrida**

Promedio (mEq/L)	S.D.	C. V. %
148	5	4
139	14	10

**Referencias**

1. Tietz, N. W., *Fundamentals of Clinical Chemistry*, W. B. Saunders Co., Philadelphia, PA, p. 874.
2. Henry, R. F. et al., *Clinical Chemistry Principles and Techniques*, 2<sup>a</sup> Ed., Harper and Row, Hagerstown, M. D., (1974).
3. Maruna, RFL, *Clin. Chem. Acta*, 2:581, (1956).
4. Trinder, P., *Analyt. J.*, 76:596, (1951).

PI: DC371-S01 Rev: 12/15/14

Manufactured for:

Dabis LLC.  
Miami, FL 33181 USA  
Phone: 305.545.6487



## ANEXO 3. LITERATURA SUERO CONTROL COMERCIAL

NIVEL  
**2**

### SUERO LIOFILIZADO PARA CONTROL DE CALIDAD EN QUÍMICA CLÍNICA

#### APLICACIONES DEL ARMOTROL

Estudios de precisión intralaboratorial en los que se requiera utilizar materiales de control de matriz humana estables en el tiempo, empleándose en el control de calidad interno evaluando la reproducibilidad de los valores obtenidos y en la preparación de las gráficas de Levey y Jennings ó "cartillas de control" para el aseguramiento de la calidad en química clínica. Además, se puede emplear como muestra desconocida en encuestas interlaboratoriales de Programas de Evaluación Externas de la Calidad.

Armotrol contiene los componentes habitualmente determinados en los laboratorios de análisis, en el área de Bioquímica Clínica, los valores asignados a los distintos analitos del suero de control, han sido obtenidos por reactivos de diferentes casas comerciales de forma manual y automatizada, aplicando los métodos que se presentan en la tabla de rango de valores anexa a la literatura.

#### REACTIVOS PROVISTOS

Cada vial contiene material de control para reconstituir con 5 ml y sus valores dependen del nivel y lote que presenta la etiqueta.

Control nivel 2: suero homogeneizado y liofilizado con concentraciones de metabolitos, enzimas y electrolitos dentro de los valores de referencia o en los niveles críticos de decisión médica.

#### REACTIVO NO PROVISTO

Agua bidestilada o desionizada.

#### INSTRUCCIONES PARA SU USO

- Abrir el vial, retire lentamente el tapón de goma evitando pérdidas del material liofilizado.
- Reconstituir con 5,00 ml de agua bidestilada o desionizada, la cual, debe ser medida con exactitud (utilice bureta o pipeta de doble aforo).
- Tapar y mezclar suavemente por inversión, evite la formación de espuma. **No agitar.**
- Dejar disolver unos 20 minutos a temperatura ambiente, mezclando por inversión de tanto en tanto.
- Antes de usar se debe mezclar por inversión.

#### PRECAUCIONES

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro". Estos sueros controles han sido preparados a partir de material con serología negativa para sífilis, Hepatitis B y C, Chagas, y VIH. Sin embargo, los controles y todas las muestras derivadas de la sangre deben manipularse aplicando las normas de bioseguridad para materiales de riesgo biológico.

Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de química clínica.

Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

#### ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Una vez reconstituidos los Controles, sus componentes son estables hasta 15 días en congelación excepto la fosfatasa alcalina cuya actividad puede aumentar con el tiempo. Para evitar la degradación de la bilirrubina es necesario mantener las alícuotas en oscuridad.

Para un mayor rendimiento del material de control, se sugiere que luego de su reconstitución, se separe en alícuotas en recipientes con cierre hermético (tubos eppendorf) y se conserven congelados a (-20°C) protegidos de la luz. Las fracciones deben ser descongeladas una única vez a temperatura ambiente, homogeneizándolas mezclándolas por inversión antes de ser utilizadas.

#### INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

Cualquier variación de los caracteres organolépticos del suero control (como decoloración, humectación del liofilizado, disolución incompleta con abundante floculación o formación de grumos, exceso de turbidez), puede ser indicio de deterioro del mismo.

#### PROCEDIMIENTO

Los controles reconstituidos se deben usar de la misma manera que la muestra desconocida, de acuerdo a las instrucciones que acompañan al equipo de reactivos que se emplean para cada determinación analítica.

#### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Fallas en la reconstitución o en la conservación pueden ser causa de resultados erróneos.

#### PRESENTACION

6 viales de 5 ml

**SUERO LIOFILIZADO PARA CONTROL DE CALIDAD EN QUÍMICA CLÍNICA**

Lote: 1000 - 03  
EXP: Agosto 02 - 2018

**METABOLITOS**

METABOLITO	METODO	VALOR MEDIO	1 DE	RANGO
Acido úrico (mg/dl)	Enzimático uricasa, peroxidasa	4,00	0,80	2,40 - 5,60
Albumina (g/dl)	Colorimétrico Verde de bromocresol sulfonftaleína	3,44	0,69	2,06 - 4,82
Bilirrubina directa (mg/dl)	Colorimétrico ácido sulfanílico diazotado	0,75	0,34	0,08 - 1,43
Bilirrubina total (mg/dl)	Colorimétrico ácido sulfanílico diazotado	1,32	0,59	0,13 - 2,51
Calcio (mg/dl)	Colorimétrico directo con el uso de Arsenazo	8,40	0,68	7,04 - 9,76
Colesterol (mg/dl)	Enzimático lipasa, colesterol oxidasa, peroxidasa	100	10,00	80 - 120
Colesterol HDL (mg/dl)	Colorimétrico sin precipitación	31	6,20	19 - 43
Creatinina (mg/dl)	Cinético de Jaffe	0,72	0,14	0,43 - 1,01
Fósforo inorgánico (mg/dl)	UV con el uso de molibdato	7,60	1,52	4,38 - 10,64
Glucosa (mg/dl)	Enzimático glucosa oxidasa, peroxidasa	150	28,00	294 - 406
Hierro (ug/dl)	Colorimétrico directo Ferene en medio ácido	48	7,20	34 - 62
Magnesio (mg/dl)	Colorimétrico con el uso de clorofenolato	1,50	0,30	0,90 - 2,10
Proteínas Totales (g/dl)	Colorimétrico de Biuret	4,88	0,98	2,93 - 6,83
Triglicéridos (mg/dl)	Enzimático lipoproteína lipasa, glicerol fosfato oxidasa, peroxidasa	100	15,00	70 - 130
Urea (mg/dl)	Cinético ureasa, glutamatodeshidrogenasa	19	3,80	11 - 27

**ELECTROLITOS**

ELECTROLITO	METODO	VALOR MEDIO	1 DE	RANGO
Cloro (Cl) (mEq/L)	Electrodo ion selectivo	73	16,95	51 - 95
Potasio (K) (mEq/L)	Electrodo ion selectivo	2,3	0,52	0,46 - 4,14
Sodio (Na) (mEq/L)	Electrodo ion selectivo	107	16,05	75 - 139

**ENZIMAS**

ENZIMAS	METODO	VALOR MEDIO	1 DE	RANGO
Alanina aminotransferasa (ALT/TGP) (IU/L)	Cinético UV optimizado (IFCC)	13	3,25	7 - 20
Amilasa (IU/L)	Cinético con el uso de CNPG3 como sustrato	90	22,50	45 - 135
Aspartato aminotransferasa (AST/TGO) (IU/L)	Cinético UV optimizado (IFCC)	16	4,00	8 - 24
Creatin Kinasa Total (CK) (IU/L)	Cinético UV optimizado (IFCC)	52	10,40	31 - 73
Creatin Kinasa MB (CKMB) (IU/L)	Cinético con el uso de anticuerpos anti CKM basado en la técnica optimizada de la IFCC	11	2,20	7 - 15
Fosfatasa Alcalina (ALP) (IU/L)	Cinético optimizado (IFCC) p nitrofenilfosfato	65	13,00	39 - 91
Gamma glutamil transferasa (GGT) (IU/L)	Cinético de SZKZ modificado	14	2,80	8 - 20
Lactato deshidrogenasa (LDH) (IU/L)	Cinético UV optimizado (IFCC)	178	35,60	107 - 249
Lipasa (IU/L)	Cinético (nitrrosulfina)	20	6,00	8 - 32

