



71
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

EVALUACION DE CINCO PRUEBAS
ANALITICAS (GLUCOSA, UREA, ACIDO
URICO, CREATININA Y COLESTEROL)
EN EL EQUIPO AUTOMATIZADO
HITACHI 717

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

ANTONIO VALADEZ MONTOYA

ASESORES: Q.F.B. Martha Sánchez Rodríguez

Q.F.B. Sergia García González

MEXICO, D.F.

MAYO 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

mis asesores.

Q.F.B. Martha Sánchez Rodríguez

Q.F.B. Sergia García González

Gracias por todo su valioso tiempo prestado y por sus excelentes comentarios vertidos en la elaboración de este trabajo y aporte de inagotables conocimientos.

A mis Profesores.

Mis mas sinceros agradecimientos a todos aquellos profesores que directamente e indirectamente tuvieron que ver en el desarrollo de *mi carrera* y espero no defraudarlos, siempre llevare en alto el conocimiento aprendido por ustedes.

Gracias.

Esta tesis fue realizada en los Laboratorios Clínicos de México S, A de C, V, (Laboratorios Frontera) y agradezco a sus directivos así como a la Q.F.B Elisa Castillo y *Sergia García* por su apoyo prestado en la realización del presente trabajo.

MI MAS SINCERO AGRADECIMIENTO AL JURADO

PRESIDENTE: Q.F.B. MARTHA SANCHEZ RODRIGUEZ

VOCAL: Q.F.B. SERGIA GARCIA GONZALEZ

SECRETARIO Q.F.B. ARACELI GARCIA DEL VALLE

SUPLENTE Q.F.B. LUZ MARGARITA CHAVEZ MARTINEZ

SUPLENTE. Q.F.B. MA DEL PILAR CEDILLO MARTINEZ

DEDICATORIA

Dedico este trabajo.

A mis padres.

Ma de Jesús y José Guadalupe

Gracias por su amor, confianza, cariño, paciencia y fe. Mi respeto profundo, mi gratitud infinita y mi admiración, para toda una vida llena de trabajo y ejemplo continuo.

Que dios los bendiga

A mis Hermanos.

Ma de Jesús, Ma Guadalupe, Mayda, Santiago y Marthita.

Por su paciencia, apoyo y por la alegría de ser una familia unida, los quiero mucho.

A Gabriela

A ti, con amor y ternura

Con mi admiración y cariño constante.

Gracias por tu tiempo, comprensión, tu apoyo desinteresado y por tu fe en mí.

A mis compañeros de trabajo.

Emilia, Angeles, Paty gracias por su ayuda y especialmente a Silvia por su gran apoyo que me brindo cuando más lo necesite y sobre todo por ser mi gran amiga.

Y Finalmente a mis sobrinos.

Guicho, Socorro, Erik, Cuca, Pelón, Kiko, Bola, Francis, Toñito, por que algún día lleguen a terminar una carrera.
Que dios los cuide

INDICE

Introducción	3
Marco teórico	6
Glucosa	
Propiedades Físicas y Químicas	21
Significancia Clínica	22
Urea	
Propiedades Físicas y Químicas	25
Significancia Clínica	25
Acido Urico	
Propiedades Físicas y Químicas	28
Significancia Clínica	28
Creatinina	
Propiedades Físicas y Químicas	31
Significancia Clínica	31
Colesterol	
Propiedades Físicas y Químicas	33
Significancia Clínica	33
Planteamiento del Problema	36
Objetivos	39
Hipótesis	40

Reactivos, equipo y material	41
Técnicas:	
Determinación de glucosa en el Hitachi 717	44
Determinación de urea en el Hitachi 717	48
Determinación de ácido úrico en el Hitachi 717	53
Determinación de creatinina en el Hitachi 717	57
Determinación de colesterol en el Hitachi 717	61
Diseño de la investigación	65
Metodología	66
Método estadístico	
Linealidad del método	69
Exactitud y repetibilidad al 100%	71
Precisión (Reproducibilidad)	71
Estabilidad de la muestra analítica	73
Determinación de límite de detección	76
Resultados	
Tablas	78
Gráficas	86
Análisis de Resultados	102
Discusión de resultados	107
Conclusiones	109
Bibliografía	110

Introducción

Desde tiempos remotos los enfermos han buscado ayuda, pedido consejo y tratamiento a diversos individuos que sobresalían por su personalidad, conocimiento, ambiciones, posición de autoridad en la sociedad o religión para mitigar tales padecimientos. Entre estos individuos muchos reconocieron que hacerle preguntas a un paciente, examinarlo físicamente y analizar la orina o suero, entre otras acciones, mejoraba la pertinencia de sus consejos o tratamientos.¹

El diagnóstico por el Laboratorio es actualmente el soporte de la medicina moderna que fundamenta, confirma o corrige el diagnóstico clínico presuntivo, el pronóstico y el seguimiento de la evolución de las patologías detectadas. El Laboratorio Clínico tiene, además, un papel significativo en la medicina preventiva, en lo que toca a la comprobación de la incidencia, prevalencia y morbilidad de enfermedades transmisibles y/o degenerativas.²

Un Laboratorio Clínico de acuerdo con la Ley General de Salud, artículo 139 de la sección primera del capítulo IX del Reglamento de la Ley General de Salud en materia de prestación de Servicios de Atención Médica, es definido como un establecimiento ligado a algún servicio de atención médica que tenga como fin *coadyuvar en el estudio, resolución y tratamiento de los problemas clínicos.*³

El Laboratorio Clínico colabora con el personal médico para el diagnóstico y tratamiento de los problemas de salud de los pacientes. Difícilmente puede haber un aspecto más importante de laboratorio que la ejecución e interpretación de los datos obtenidos, de hecho, el requerimiento de una determinada prueba de laboratorio genera una gran cantidad de maniobras, cuyo objetivo es la obtención de un informe analítico.^{4,5}

Existen enfermedades, donde el valor exacto y preciso de un determinado metabolito, permite establecer un diagnóstico adecuado o determinar la gravedad del caso, por ello el Laboratorio Clínico requiere, además de equipos y personal capacitado, técnicas analíticas confiables para la cuantificación de metabolitos.⁵

Todo analista sabe que existe un mayor o menor grado de inexactitud en los resultados que obtiene en sus análisis.

Por ejemplo, si en el análisis de una glucosa en sangre se obtiene un resultado de 100 mg/100 dL, es obvio que la concentración real de glucosa probablemente no será 100 mg/100 dL. Por otra parte, si el mismo analista repite la determinación o lo hace otro analista, el resultado probablemente se desviará algo del que se obtuvo en el primer análisis. Es esencial que el analista tenga una idea de la magnitud en la variabilidad de sus resultados y de los diversos factores que puede contribuir a la misma.^{5,6}

Una forma de verificar que estas variaciones no sean grandes es con el uso de materiales de control. Los valores del análisis de materiales de control se vigilan contra intervalos de confianza preestablecidos para verificar la precisión y la exactitud de las mediciones. La exactitud de la medición comprueba si el resultado es correcto, mientras que la precisión de la medición verifica la capacidad del método para seguir siendo correcto al efectuar mediciones repetidas en un transcurso de tiempo.^{7,8} Una razón para intentar que el error de una determinación sea lo más pequeño posible es que, cuanto más pequeño sea el error, mayor será la potencialidad diagnóstica de la determinación. Estos conceptos pueden abordarse de manera cuantitativa recurriendo a conceptos estadísticos simples.⁸

Es necesario examinar si los métodos de laboratorio son exactos y precisos ya que *no se puede suponer que el método tenga ambas cualidades confirmando tan sólo una de ellas*. Es posible que el método sea preciso porque al repetir las mediciones se obtengan valores muy similares, pero tal vez el valor que se repita no sea el verdadero y por lo tanto el método no será exacto.^{9,10}

Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la **validación** del mismo, es decir, se debe contar con evidencia documentada para demostrar la confiabilidad, reproducibilidad y efectividad de cualquier operación analítica empleando este método. La validación generalmente incluye la evaluación de precisión, linealidad, exactitud.¹¹

La base del concepto de validación de métodos analíticos tiene sus orígenes a partir de tres comunicados emitidos por la FDA (Food and Drug Administration). El primero de ellos, 1906, exige a los fabricantes de productos farmacéuticos evitar su adulteración.

El segundo, en 1938, convoca a los mismos a eliminar de las formulaciones aquellas sustancias que pudieran causar algún efecto tóxico, esto es brindar seguridad al momento de usar un medicamento. El último de ellos, en 1962, pide comprobar plenamente la eficacia de un producto farmacéutico.¹²

A partir de esta fecha, se creó por primera vez en la historia, una reglamentación que se enfoca a las prácticas correctas de manufactura de medicamentos (GNP's). Esto es, considerar todos aquellos factores que contribuyen a la calidad en los procesos, así como la reproducibilidad. La demostración de que estos procedimientos son correctos se conoce con el nombre de **validación**.^{11,12,13}

Sin embargo, fué hasta 1988 que, después de una serie de acuerdos entre la FDA y asesores de la industria farmacéutica, que lanzan acuerdos similares a los establecidos por la Industria Farmacéutica y se dictan lo que serían la buenas prácticas de laboratorio regidas por el Clinical Laboratories Improvement Act 88 (CLIA 88); igualmente se establece el significado del proceso de validación, criterios y limitantes para considerar la validez de un proceso. Por otra parte CLIA 88 regula todo lo concerniente a los Laboratorios Clínicos en los Estados Unidos.^{13,14}

En México existen muy pocos Laboratorios Clínicos comprometidos con la calidad, es decir, la evaluación de métodos o técnicas analíticas en la cuantificación de metabolitos, pues no se cuenta con un organismo que obligue a los laboratorios clínicos a establecer métodos validados como rutina.^{5,15}

Asegurar la calidad al elegir un nuevo método es un proceso de preservación de calidad que se realiza antes de introducir un nuevo procedimiento al laboratorio y antes de que se establezcan programas de control de calidad internos y externos. Si se detecta algún cambio en la competencia analítica después de establecer un nuevo método, se repiten diversos procedimientos originales para la evaluación del método con el fin de volver a verificar el desempeño óptimo^{5,16}

Marco Teórico

La Ley General de Salud en el apartado quinto, artículo 1127, capítulo I, Título Vigésimoprimer, del Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios, menciona que para la Industria Farmacéutica, los establecimientos deberán contar en su caso, con las instalaciones, equipo necesario y manual de procedimientos para efectuar los controles analíticos de materias primas, productos en proceso, preparados farmacéuticos, productos terminados y material de acondicionamiento, debiéndose conservar constancia de todas las operaciones que se efectúen con la comprobación del resultado y la validación de cualquier técnica empleada. A este respecto el laboratorio clínico es considerado como un *servicio auxiliar de diagnóstico y tratamiento* (Cap IX, Sec. Primera, Art.140 Ley Gral Salud) y se rige dentro de ese marco legal. Una de las áreas que conforma el laboratorio clínico es la de química sanguínea.³

La preservación de la calidad en la operación de un moderno laboratorio de Química clínica exige el empleo de diferentes métodos para asegurar la exactitud de los resultados obtenidos, los medios para lograr esta seguridad son muchos y muy variados y la cooperación internacional para formular guías y requerimientos de sistemas de control de calidad se encuentra sólo en sus comienzos.^{17,18}

El propósito de los mismos es detectar problemas que puedan llevar a interpretaciones clínicas inexactas, los sistemas de control de calidad destinados a evaluar el ciclo total del análisis están cobrando mayor importancia porque los errores cometidos durante la recolección, transporte y la circulación de los datos se han vuelto relativamente más frecuentes a medida que instrumentos, métodos, estándares, etc., han mejorado.^{18,19,20}

La finalidad del Control de Calidad es evitar cometer errores, sin embargo nos damos cuenta que esta meta no se obtendrá totalmente, aunque no por esto se dejará de alcanzar.²¹

Algunos laboratorios clínicos han implementado una serie de medidas que conduzcan a resultados confiables y están tomando medidas similares a las empleadas por la Industria Farmacéutica, una de ellas es la **validación**, la cual se encuentra contemplada dentro de la Ley General de Salud. (Capítulo 1, Art. 1127) y en la Norma Técnica para la organización y funcionamiento de los servicios auxiliares de diagnóstico y tratamiento de la Secretaría de Salud, que en este momento se encuentra en revisión y se rige dentro de este marco legal.³

Uno de los problemas con que se enfrenta el Laboratorio Clínico es la obtención de pequeñas cantidades de muestra para analizar un determinado metabolito en recién nacidos, la obtención de líquido cefalorraquídeo, o bien cuando el reactivo es difícil de conseguir y se cuenta con cantidades mínimas para llevar a cabo la prueba, por no ser posible utilizar los métodos convencionales de análisis registrados en el instructivo del reactivo comercial. Por tal motivo, el químico clínico se ve en la necesidad de suponer que al reducir a la mitad las muestras para analizar un metabolito por un método establecido, el comportamiento de éste se mantiene igual, es decir se mantiene la linealidad, precisión, exactitud, reproducibilidad y límite de cuantificación, tal suposición no es válida por ser el analito de naturaleza biológica, lo que nos lleva a verificar los parámetros anteriores a través de la validación del método elegido.^{1,22,21}

Cada método de análisis debe describir no sólo las mediciones y observaciones implementadas en el laboratorio, sino también la verificación de las características de ejecución que se deban cumplir tanto por el fabricante de los reactivos como por el procedimiento analítico.²⁴

Los beneficios que aporta la validación de métodos analíticos son grandes, ya que ésta nos permite conocer el comportamiento de un proceso bajo diferentes condiciones de operación y posteriormente utilizarlo en la rutina. El método debe probarse para determinar su efectividad y para diagnosticar en forma correcta las enfermedades, lo cual se determina obteniendo la precisión

y exactitud, que son medidas del comportamiento del método.^{22,23,24} En otras palabras, al llevar a cabo tal medida, el investigador puede asegurar que el método, los instrumentos, equipo y reactivos utilizados en el análisis de un analito son adecuados para esta determinación por el personal que ahí labora.^{25,26}

Los métodos que son establecidos por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) o de algunas otras fuentes reconocidas de estándares de referencia deben ser adecuadamente validados, debido a que nuevas condiciones pueden alterar sus características. Existen requisitos para validar un método cada vez que el problema requiera el empleo de datos, los cuales son susceptibles a errores experimentales y los métodos estadísticos constituyen el medio seguro y lógico para tratarlos.^{27,28}

Para cuantificar un metabolito existen varios métodos, de los cuales sería ideal tener un registro de cuantos laboratorios utilizan un método específico. En México no existen este tipo de registros, pero en países industrializados se llevan estadísticas de ello. Por ejemplo, en un reporte de investigación al respecto realizado en Francia en 1988, se tiene que para determinación de glucosa, el 82 % de los laboratorios utilizan el método enzimático de glucosa oxidasa, el 5.5% glucosa deshidrogenasa, el 6 % métodos químicos y el resto no proporcionó información.²⁹

Ante cualquier variación a lo estipulado en la técnica original, se requiere de una validación analítica para asegurar la exactitud y precisión de nuestro método analítico. De nada sirve tener los mejores programas de control de calidad si nuestros métodos analíticos no arrojan resultados repetibles y reproducibles.^{5,29}

La **validación** es el método científico, que proporciona la evidencia documental para demostrar la confiabilidad, reproducibilidad y efectividad de cualquier operación o proceso, (el proceso se encuentra bajo control) y tiene

como objetivo determinar la exactitud, precisión y especificidad tanto del sistema analítico como del procedimiento de análisis.

La validación es un requerimiento registrado y estipulado en las Buenas Prácticas de laboratorio, la cual verifica que procedimientos, equipos, metodología analítica, procesos, áreas, servicios, componentes, mantengan sus características, comportamiento, funcionamiento, confianza, precisión o exactitud, acordes al propósito por el cual fueron diseñados. Es conveniente por lo tanto definir algunos de los conceptos básicos utilizados en este proceso , como lo son:^{11,12,13}

La linealidad de un método analítico, es la habilidad de éste para asegurar que los resultados experimentales (los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida), son proporcionales a la concentración del analito dentro de un rango determinado. La linealidad de un método analítico mide el grado en que la respuesta del método, al trabajar a diferentes concentraciones se aproxime a una función lineal del tipo $Y=BX+A$.^{26,27,28,42}

El intervalo de un método analítico está definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles de concentración superior e inferior de la sustancia (incluyendo estos niveles), en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal utilizando el método descrito.^{26,27}

La exactitud analítica es una medida de la concordancia entre el valor obtenido para una determinación y su valor real. La exactitud, término conceptual, no posee un correlato numérico por lo que, como término cuantitativo se usa la inexactitud, que se define como la diferencia numérica entre el valor medido en una serie de determinaciones y su valor verdadero. La diferencia, positiva o negativa, puede expresarse en las mismas unidades en que se mide la magnitud o como porcentaje del valor verdadero.^{5,28} La diferencia positiva o negativa, puede expresarse en las mismas unidades en que se mide la magnitud o como porcentaje del valor verdadero.^{5,28}

En todo proceso de validación es indispensable evaluar la exactitud del sistema sobre todo para tratar de establecer el posible efecto de los analitos sobre la adecuada correlación entre la respuesta del analizador y la concentración real del analito. Para determinar la exactitud del sistema se evalúa el comportamiento de diferentes niveles de concentración de la sustancia de referencia ante la respuesta del analizador.^{5,12,13}

La precisión es el error debido al azar, la variación de los resultados obtenidos con una técnica cuando la misma muestra se analiza repetidamente; en otras palabras, la precisión es la reproducibilidad de lo que se observa. Cuanto menor sea la variación observada, mayor será la precisión. Se recomienda el término imprecisión como término cuantitativo y se define como la desviación estándar o el coeficiente de variación de los resultados de un conjunto de medidas repetidas.^{5,11,12,13}

La reproducibilidad es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo distintas condiciones (diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios utilizando el mismo y/o diferentes equipos, etc.).^{11,12,13}

El límite de detección es la mínima concentración de una sustancia de una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones de operación establecidas.^{12,13}

El límite de cuantificación, es la menor concentración de una sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones normales de operación establecidas.^{12,13}

La especificidad es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.¹³

La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de las mismas muestras bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, columnas, sistemas de elución, tipos de empaque (soporte, fase estacionaria, etc.), condiciones ambientales etc.^{11,12,13}

La **estabilidad de la muestra**, es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación de conservar su integridad fisico-química y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.^{11,12}

Los instrumentos analíticos que se usan en los laboratorios clínicos, son cada vez más complejos, muchos de ellos en la actualidad son sistemas cerrados con equipo y reactivos cuidadosamente seleccionados, sin embargo existen otros que son flexibles en cuanto al tipo de reactivos y métodos que pueden aplicar, algunos son instrumentos diseñados para un solo procedimiento.^{18,31}

La automatización ha recorrido un largo camino en corto espacio de tiempo desde la primera descripción de un sistema de análisis automático en 1957 hasta el momento actual. El término automatización se ha aplicado en el campo del Laboratorio Clínico a los instrumentos de análisis capaces de realizar un gran número de pruebas con poca intervención de los operadores.^{18,32}

Un analizador automático es una máquina capaz de realizar varias manipulaciones de forma mecánica con objeto de producir un resultado. Los analizadores automáticos combinan el procesado de las muestras y la medida de las señales generales con la presentación del resultado final.^{18,12,32}

La automatización ha sido fundamental para resolver el incremento de trabajo de los laboratorios, sin embargo, el desarrollo de los Sistemas Automáticos no se ha producido únicamente como solución al número cada vez mayor de solicitudes recibidas por el laboratorio, sino también como mejor forma de controlar todos los pasos y conseguir que todas las muestras que se analizan estén sometidas a las mismas manipulaciones. Existen diferentes tipos de analizadores que son los siguientes:^{18,33}

Analizadores de Flujo Continuo: Son sistemas que mezclan las muestras y los reactivos bombeando la muestra aspirada a una corriente continua de reactivo. Un analizador de flujo continuo es el SMA fabricado por Techicon Instruments Corporation, las versiones actuales de SMAC^{34,43} pueden procesar hasta 150 muestras por hora, efectúan 23 pruebas por minuto, utilizan código de barra para identificar las muestras, utilizan reactivos a granel y requieren poca manipulación. Las mediciones se efectúan por fotometría de absorción, con una celda estacionaria de flujo y filtros para seleccionar la longitud de onda.^{5,32,43}

Analizadores Discretos: Son sistemas en los que la mezcla de la muestra y los reactivos se producen de forma discreta, es decir, que cada mezcla de reacción tiene lugar en una cubeta individual. La muestra se dispensa en la cubeta de reacción y los reactivos se adicionan discontinuamente por medio de dispensadores o dilutores. La mezcla de las muestras y los reactivos se consiguen por inyección a presión, agitadores externos o internos, vibradores o ultrasonidos.^{8,18}

Hay diferentes tipos de analizadores discretos:

1. **Analizadores Monocanales por Lotes:** Son sistemas que realizan una única determinación en forma simultánea sobre varias muestras.^{8,18,32}
2. **Analizadores Multiparámetros Selectivos:** Son instrumentos capaces de realizar varias pruebas diferentes sobre cada muestra, estos analizadores poseen un solo sistema de toma de muestra y dispensación de reactivos y un solo canal de lectura fotométrica, estos analizadores presentan un número variable de técnicas, que pueden realizarse simultáneamente, de acuerdo a los diferentes modelos.^{8,18,32}
3. **Analizadores Multicanal Paralelo:** Son sistemas que realizan simultáneamente varias determinaciones, que pueden seleccionarse en una misma muestra. Estos sistemas contienen varios canales, en cada uno de los cuales se realiza una determinación. La muestra se aspira por una pipeta de Thoma que reparte la cantidad necesaria a cada canal con un sistema de pipetas propio para la adición de los reactivos; cada canal posee un sistema fotométrico de lectura.^{8,18,32}

Existen en el mercado diferentes analizadores discretos Eastman Kodak fabrica y distribuye los analizadores Ektachem³¹, que son ejemplo de la tecnología de química seca. Las muestras se aplican en tiras impregnadas de reactivos que se dispensan automáticamente en cartuchos específicos para efectuar determinada prueba, las tiras se incuban en cámaras de aire caliente y el color que se desarrolla se mide por fotometría de reflectancia en el extremo inferior de la tira, cada tira contiene reactivos para una sola prueba ³¹

Otro ejemplo del concepto de pruebas unitarias son el ACAIV de Dupont, DIMENSIÓN,³⁶ SYCHRON CX3, ASX,CX4,CX5 de Beckman Instruments, OPTICHEM 180 Y 120 de Coulter Electronics Inc. Olympus Corporation ofrece AU5000, REPLY y DEMAND. Por su parte Boehringer Mannheim Diagnostics distribuye los analizadores HITACHI,^{37,24,38,39} que utilizan jeringas de desplazamiento positivo para aspirar y suministrar muestras y reactivos a celdas que se encuentran dentro de baños de agua y que mantienen una temperatura de agua estable, generalmente a 37° C.

El muestreo se efectúa a partir de un tubo de recolección primario o de recipientes que contiene alícuotas. Los códigos de barras facilitan la identificación de las muestras, al terminar las reacciones, se lee la absorción en la celda de reacción utilizando un espectrofómeto con rejilla de difracción y detectores a longitudes de onda fijos. Para determinar las lecturas bicromáticas, las celdas se lavan y se verifican ópticamente, de manera que queden listas para la siguiente determinación.^{8,12,40}

Existen cartuchos de electrodo ión-selectivo para la determinación de sodio, potasio y cloruro. Los reactivos que se obtienen con Boehringer Mannheim y muchos otros proveedores, se empacan a granel y requieren poca o ninguna preparación. Además, estos instrumentos pueden adaptarse para aplicaciones del propio laboratorio, ya que los parámetros de prueba se programan manualmente. Los instrumentos tienen compartimientos refrigerados para almacenar los reactivos, pero hasta el momento las zonas de carga no tienen control de temperatura.⁴¹

Existe gran cantidad de instrumentos automatizados y cada uno de ellos tiene algo que ofrecer para mejorar el funcionamiento del laboratorio clínico, siempre y cuando estos se encuentren validados.^{12,40}

Los analizadores HITACHI ofrecen muchas funciones de auto monitoreo y control de calidad de tiempo real.

El analizador VP (Abbott) es un ejemplo representativo de analizador monocanal por lote. Este sistema consta de dos módulos conectados eléctricamente, el módulo procesador y el módulo de control. Las muestras se colocan en un bandeja giratoria que admite 32 pocillos y en cuyo centro se encuentra una cavidad, donde va alojada una multicubeta de plástico desechable, formada por 32 cubetas de reacción. La multicubeta va sumergida en un baño de agua que permite ajustar su temperatura a 25, 30, ó 37C°.

Este sistema está capacitado para realizar determinaciones de punto final y de velocidad de reacción. En las técnicas de punto final se utiliza la diferencia de absorbancia entre la última vuelta programada y la primera vuelta. En las técnicas de velocidad de reacción se usan las diferencias de absorbancia entre dos vueltas consecutivas a partir de la primera programada. La velocidad de funcionamiento para el VP es de unas 450 determinaciones por hora para las técnicas cinéticas.

Analizadores Centrífugos. La acción de la fuerza centrífuga se ha utilizado para la mezcla de muestras y reactivos en analizadores automáticos. Estos sistemas han ocupado un puesto importante en los Laboratorios Clínicos desde su descripción por primera vez en 1968. Actualmente han perdido ese papel estelar.^{18,32}

Los analizadores en paralelo son analizadores centrífugos desarrollados con fondos federales en el OakRidge National Laboratory, sus principios no han sido patentados. Diversos fabricantes producen analizadores centrífugos, incluyendo: GemEni de Electro-Nucleonics, Cobas de Roche⁴², CENTRIFICHEM de J. T. Baker, ABA 100, VP Analizer de ABBOTT⁴³. Las muestras y los reactivos se transfieren a compartimientos discretos insertados en un rotor mediante jeringas de desplazamiento positivo, de manera que cuando éste se acelera, las muestras y los reactivos se mezclan en una celda que se encuentra en la sección más externa por la fuerza centrífuga

La temperatura se controla con baños de aire o calentadores montados en los rotores. Las mediciones se realizan mediante filtros específicos para determinada longitud de onda y un tubo fotomultiplicador que toma la lectura. En general, los analizadores centrífugos son instrumentos discontinuos (para lotes) capaces de determinar únicamente un analito a la vez.¹².

Los analizadores automáticos para el área de química clínica constan fundamentalmente, de los siguientes componentes:

1. Dispositivos de carga de muestra
2. Sistemas de toma y dispensación de las muestras.
3. Sistemas de dispensación de reactivos.
5. Baños de incubación.
6. Detectores.
7. Procesadores de datos.
8. Impresoras.

1.-Dispositivos de carga de las muestras. Las muestras que desean analizarse se colocan en copas de plástico desechables en bandejas, gradillas, o cadenas transportadoras con capacidad variable, según la velocidad de trabajo del analizador. Generalmente, cada analizador utiliza copas de muestra de forma diferente, diseñadas de manera que el volumen muerto (volumen de muestra que no puede utilizarse) sea mínimo y que se produzca poca evaporación cuando no estén tapadas. La mayor parte de los analizadores automáticos poseen tapas individuales para las copas o tapas para todo el dispositivo de carga de las muestras. En la actualidad la mayoría de los analizadores admiten tubos primarios de muestra, esto es, los mismos tubos de extracción, una vez centrifugado, ya que las pipetas de toma de muestra disponen de sensores de nivel que detienen su acción, cuando alcanzan el nivel de la muestra.

2.-Sistema de toma y dispensación de las muestras. Las muestras se toman de sus contenedores (copas o tubos primarios) y son llevadas o dispensadas a sus lugares de reacción por dos mecanismos diferentes

En los sistemas de flujo continuo, una bomba peristáltica aspira la muestra que es llevada a una corriente continua de reactivo, de forma que la cantidad de muestra aspirada depende del diámetro interno del tubo. Los analizadores discretos utilizan jeringas de desplazamiento líquido positivo. La pipeta aspira la muestra y luego la dispensa en el lugar de reacción, bien sola o mezclada con diluyente o reactivo. Las jeringas pueden ser de volumen fijo o variable.

Las primeras sólo pueden tomar y dispensar una cantidad fija de muestra, mientras que las segundas pueden tomar y dispensar volúmenes con pequeños incrementos. Las jeringas de volumen fijo suelen utilizarse en analizadores capaces sólo de realizar una pequeña variedad de pruebas, y las jeringas de volumen variable se utilizan en analizadores que llevan a cabo múltiples determinaciones.

3.-Sistemas de dispensación de los reactivos. Los reactivos se encuentran, en la mayoría de los analizadores automáticos, en forma líquida dentro de contenedores de vidrio o plástico, cuyo tamaño depende de la estabilidad y de la tasa de trabajo del analizador. Cada prueba utiliza, normalmente, uno o dos reactivos, aunque algunos analizadores permiten el uso de tres o más, el compartimiento de reactivos suele contener dos partes, una refrigerada de 4 a 8 °C y la otra a temperatura ambiente. De forma análoga a los sistemas de toma y dispensación de muestras, los reactivos pueden ser tomados y llevados a los lugares de reacción de dos formas distintas. En los analizadores de flujo continuo, los reactivos son llevados por medio de tubos accionados por una bomba peristáltica y en los analizadores discretos, por medio de pipetas, conectadas a jeringas de desplazamiento positivo, en el caso de reactivos, con las muestras, las jeringas pueden ser de volumen fijo o de volumen variable.

Dispositivos de muestras y de reactivos En los analizadores de flujo continuo, la mezcla de muestras y reactivos se produce por intersecciones en Y de los tubos transportadores. Una vez en el mismo conducto, las muestras y los reactivos se mezclan por acción del flujo. En los analizadores discretos, la mezcla se ocasiona en las cubetas de reacción.

Los principales sistemas de mezcla son:

- 3.1. Agitadores de barra.
- 3.2. Movimientos rotatorios de los contenedores.
- 3.3. Adición a presión de la muestra o reactivo al recipiente.
- 3.4. Inyección de aire a presión.
- 3.5. Agitadores magnéticos.

En los analizadores centrífugos, la mezcla de las muestras y de reactivos se producen por la fuerza centrífuga.

5.-Baños de incubación. En los sistemas de flujo continuo la incubación se ocasiona al atravesar la mezcla reactiva los tubos en espiral sumergidos en baños con la temperatura adecuada. El tiempo de incubación necesario se consigue variando la longitud y el diámetro interno de los tubos. En los analizadores discretos, las cubetas de reacción van introducidas en baños de agua termostatzados a la temperatura de incubación. En los analizadores centrífugos los rotores se encuentran en cámaras termostatzadas de aire caliente.

6.-Detectores. La mayor parte de las determinaciones de los analizadores automáticos se realizan por medio de medidas fotométricas de absorbancia. Algunos analizadores pueden realizar también medidas de turbidimetría, nefelométricas y electroquímicas. Las medidas fotométricas de absorbancia requieren tres componentes básicos, una fuente de energía radiante, un dispositivo de selección de la longitud de onda y un detector.

Las principales fuentes de energía radiante empleadas en los analizadores automáticos son las lámparas de wolframio o tungsteno, deuterio, halógenos, mercurio y xenón. Los espectros producidos se encuentran comprendidos entre 300 y 700 nm de longitud de onda

Los dispositivos selectores de longitud de onda más habituales en los analizadores automáticos son los filtros de interferencia. La amplitud de banda de los filtros de interferencia utilizados en los analizadores automáticos oscilan entre 5 y 10 nm

En los analizadores capaces de realizar varias pruebas diferentes y en los que todas las medidas se realizan en el mismo lugar con una única fuente de energía radiante los filtros suelen colocarse en una rueda que, dirigida por el microprocesador, dispone el filtro adecuado para cada medida. Algunos analizadores utilizan, para seleccionar la longitud de onda, monocromadores que proporcionan un espectro continuo de la longitud de onda. La mayor parte de los analizadores emplean un sistema de lectura de absorbancia a dos o más longitudes de onda. En los sistemas más usuales se mide la absorbancia a dos longitudes de onda (sistema bicromática).

7.-El detector convierte la energía luminosa que le llega en energía eléctrica. En los analizadores automáticos el detector más frecuente es el tubo fotomultiplicador. Los sistemas de medida de absorbancia de los analizadores automáticos poseen en general, rangos de medida de 0 a 2 U de absorbancia y una sensibilidad de alrededor de 0,001 U de absorbancia a un valor de absorbancia de una unidad.

8.-Procesadores de datos e impresoras. Las señales analógicas procedentes de los detectores se convierten en digitales por medio de convertidores adecuados. El microprocesador procesa los datos digitales con algoritmos para transformarlos en los resultados, que luego aparecen impresos en los rollos de papel continuo o en informes adecuados para su entrega.

Las decisiones clínicas se basan en la información obtenida de los enfermos mediante procedimientos diagnósticos. Cualquier medio utilizado para obtener información científica de un enfermo se puede considerar un método de diagnóstico, llámese historia clínica, examen físico, análisis de laboratorio, exámenes de gabinete u otros medios.

El diagnóstico diferencial de una enfermedad pocas veces se hace utilizando una sola prueba generalmente se requieren varias pruebas para establecer un diagnóstico definitivo. Las determinaciones de química clínica que se consideran como de rutina son:

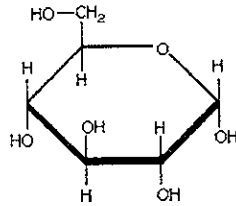
Glucosa,
Urea,
Creatinina,
Ac Úrico, y
Colesterol.

Tales determinaciones nos dan un panorama del estado general de un individuo, siendo las que más frecuentemente se realizan en un laboratorio clínico, por lo cual nos referimos a ellas

Glucosa

Propiedades Físicas y Químicas.

Glucosa, Dextrosa, Glucolín, Dextropur
Fórmula molecular: $C_6H_{12}O_6$
Peso molecular: 180.16 Daltons
Clase química: Hidratos de Carbono.



α -D-Glucosa

Fig 1. Estructura de la alfa-D-Glucosa.

Químicamente la glucosa es una aldohexosa en la cual la forma aldehídica está en equilibrio con la forma enodióica (Fig. 1), esta última estructura es la más favorecida a pH fisiológico. El equilibrio aldehído/enodiol permite que la glucosa pueda ser reducida y oxidada con facilidad. Los métodos más antiguos establecidos para la determinación de glucosa sérica se basaban en la capacidad de la glucosa para reducir directamente los iones cúpricos (Cu^{++}) a iones cuprosos monovalentes (Cu^+). Existen diversos métodos para la determinación de la glucosa como: ^{22,43}

*Reducción del ión cobre

*Folin-Wu,

*Somogyi-Nelson,

*Modificación de Benedict,

*Ferricianuro alcalino,

*Fragmentografía de masa (Neocuproína),

*O-Toluidina,

*Hexoquinasa (HK),

*Glucosa oxidasa (GO),

*Reacción acoplada (Trinder),¹⁶

*Glucosa deshidrogenasa (GDH)²⁹.

Significancia Clínica.

La glucosa (alfa y beta D -glucopiranososa), es principal alimento energético de las células, transportada por el plasma a los diferentes tejidos del organismo es catabolizada produciendo energía (vía de Embden Meyerhof) o bien produciendo los sustratos intermediarios necesarios en el anabolismo de los lípidos (ciclo de Krebs) o de los aminoácidos (vía las pentosas). Puede almacenarse en el hígado en forma de glucógeno (glucogénesis), que es degradado por las células en función de sus necesidades. La glucosa también se anaboliza a partir de diferentes sustratos (productos de degradación de la glucosa).²⁹

Diversas afecciones del metabolismo de carbohidratos se asocian con el incremento de la concentración de glucosa plasmática (hiperglucemia); la reducción de la concentración plasmática (hipoglucemia), y la concentración de glucosa plasmática normal o reducida, con frecuencia con excreción de algún azúcar reductor no glucosídico en orina (errores innatos del metabolismo de carbohidratos).⁴⁴

Un número de hormonas es importante en la regulación de la concentración de glucosa en sangre. La adrenalina produce un aumento rápido de la glucosa sanguínea por activación de la fosforilasa que desdobla el glucógeno. El glucagon tiene un efecto similar. Sin embargo, la adrenalina eleva también el lactato sanguíneo, al desdoblar el glucógeno muscular.⁷

La hormona tiroidea facilita la glucogenólisis hepática, aumentando así el azúcar sanguíneo. El efecto global de la hormona tiroidea es una ligera tendencia a la hiperglucemia.^{7,29}

Por el contrario, cuando se está en ayunas, el glucagon favorece las funciones catabólicas, tales como la glucogenólisis hepática, y estimula la formación de glucosa en conjunción con otras hormonas catabólicas. Este control biohormonal de la regulación de la glucosa requiere la secreción apropiada de diversas cantidades de ambas hormonas, que actúan en coordinación sobre el tejido adiposo, el hígado y el músculo para mantener una concentración estable de glucosa en plasma. La somatostatina actúa localmente regulando la liberación de la insulina y glucagón por el páncreas. De forma adicional, el mantenimiento de las concentraciones plasmáticas de glucosa está mediado por mecanismos adenérgicos, colinérgicos y posiblemente otros péptidos.⁴⁵

La hiperglucemia se asocia comunmente a la Diabetes mellitus, enfermedad que se caracteriza por la alteración en el metabolismo de los hidratos de carbono, proteínas y grasas. Una ausencia total de secreción de insulina puede dar lugar a hiperglucemia, lo que ocurre en ocasiones tras una pancreotomía total; también puede deberse a infiltración del páncreas en la hemocromatosis o presentarse en períodos de estrés, como sucede por ejemplo tras una infección grave, deshidratación o embarazo. La hiperglucemia puede ser secundaria a otras enfermedades endocrinológicas o incluso a un anticuerpo contra el receptor insulínico. Algunos medicamentos, como el propanolol, los diuréticos tiacídicos y la fenitoína bloquean la liberación de insulina y producen hiperglucemia, afectandose también el metabolismo de proteínas y grasas.⁴⁶ Por esta razón cargas secundarias de grasas provocan eventualmente cetosis y posiblemente coma diabético. Los efectos a largo plazo incluyen trastornos metabólicos que van seguidos de una serie de modificaciones de la fisiología normal de algunos órganos que preceden en el tiempo a las clásicas y bien conocidas alteraciones histológicas.

Los efectos a largo plazo incluyen trastornos metabólicos que van seguidos de una serie de modificaciones de la fisiología normal de algunos órganos que preceden en el tiempo a las clásicas y bien conocidas alteraciones histológicas

En esta se encuentran cambios de la hemodinámica renal y de la permeabilidad de los glomérulos, elevándose el filtrado o aclaramiento glomerular, alteración de la conducción de algunas hormonas. Así como complicaciones microvasculares y macrovasculares que de no ser corregido el estado metabólico alterado, de lo contrario conducirá a lesiones anatómicas irreversibles en riñones, arterias y retina.

Mientras que la hormona tiroidea aumenta la utilización de glucosa, la hormona de crecimiento y las hormonas corticosuprarrenales la disminuyen a esta disminución se le conoce como hipoglucemia que se define como un síndrome caracterizado por bajos niveles plasmáticos en asociación con un grupo de síntomas que se alivian con la ingesta de alimentos o hidratos decarbo. En adultos se presentan dos grupos diferentes de síntomas dependiendo de que la hipoglucemia sea aguda o crónica. Cuando la hipoglucemia se presenta rápidamente, los mecanismos homeostáticos ponen en marcha la liberación de adrenalina y aparecen sudación, inestabilidad, temblores, debilidad y ansiedad. Si la reducción de la glucosa en plasma se produce lentamente, predominan el dolor de cabeza, irritabilidad, letargia y otros síntomas propios del sistema nervioso central. Ciertos medicamentos tienen una acción hipoglucemiantes más o menos considerables. Algunos ya se utilizan con este fin tal es el caso (sulfonilureas, insulina, biguaninas, glimidina, etc.), que representan más de la mitad de las causas inducidas por fármacos.²⁹

Urea

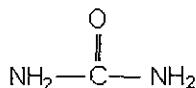
Propiedades Físicas y Químicas.

Urea (BUN, carbamina, carbonildiamina)

Fórmula molecular: $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$

Peso molecular: 60.06 Daltons

Clase química: metabolito de carbono



Urea

Fig 2. Estructura de urea

La urea (Fig 2) ha sido tradicionalmente cuantificada por análisis químico directo o indirectamente por conversión previa a amoníaco y posterior análisis. La mayoría de los métodos históricos implican la medición del nitrógeno del amoníaco (NH_3) luego de tratar las muestras mediante temperaturas elevadas (autoclave a 125°C) o por la acción de la enzima ureasa^{22,43}

Algunos de los métodos más utilizados para cuantificar amoníaco liberado de la urea son los siguientes:

- *Nesslerización,
- *Berthelot,
- *Ureasa/GLDH,
- *Conductividad ureasa,
- *Diacetilmonoxima,
- *Urea/GLDH.

Significancia Clínica:

La urea es el producto principal final del catabolismo de las proteínas y aminoácidos, y se genera en el hígado por el ciclo de la urea. A partir del hígado, la urea penetra en la sangre desde donde se distribuye a todos los líquidos intra y extracelulares, puesto que esta sustancia puede difundir libremente a través de la mayoría de las membranas celulares.⁷

La mayor parte de la urea acaba siendo excretada por los riñones, aunque también se excreta en cantidades mínimas en la sudoración y es degradada por las bacterias intestinales.⁷

Los glomérulos filtran libremente la urea, según el estado de hidratación y, por lo tanto, el flujo de orina; entre un 30 y 40% de la urea filtrada es reabsorbida de forma pasiva con el agua, sobre todo en los tubulos proximales. La urea suele constituir la mitad (25g) del total de sólidos en la orina y entre 80 y 90% del total del nitrógeno urinario.^{5,7}

La concentración de urea en el interior de los eritrocitos es significativamente menor que en el plasma debida a la presencia de grandes cantidades de hemoglobina en el interior de los eritrocitos. Aunque la medición analítica de la urea se denomina convencionalmente nitrógeno ureico en sangre (BUN), la determinación de la urea se practica en suero o plasma.

En muchas situaciones clínicas, cambios en los niveles de urea, son más dependientes de la función del riñón que del hígado, frecuentemente el BUN se realiza con el propósito de monitorear enfermedades renales, más específicamente la filtración glomerular.⁵⁰

Existen enfermedades en las cuales los niveles de urea se encuentran aumentados (Azoemia) que muchas veces se clasifica como prerrenal y posrenal. La azoemia prerrenal es el resultado de una perfusión inadecuada de los riñones y, por tanto, de una menor filtración glomerular en presencia de una función renal normal en todos los demás aspectos. Las etiologías de importancia incluyen deshidratación, shock, disminución del volumen sanguíneo y fallo cardíaco congestivo. Aunque el mayor nivel sérico de urea o del BUN que acompaña muchos casos de hemorragia gastrointestinal masiva a veces se explica sobre la base del incremento notable de la absorción de aminoácidos después de la digestión de las proteínas de la sangre, es probable que el factor más importante sea la hipovolemia debida a hemorragia. La hiperazotemia es el signo humoral más simple de la insuficiencia renal orgánica y constituye la (uremia) genuina en clínica.⁵⁰

Pero hay que tener bien clara la idea de que no toda urea alta significa uremia ni nefropatía, muchas veces la elevación de la urea obedece a causas extrarrenales. Uremia aguda. Va acompañada de anuria u oliguria con orina densa. Aunque rápidamente se alcanzan cifras altas de urea, el cuadro es, a veces, reversibles.

En la glomerulonefritis aguda, en la que, a diferencia de la crónica, la reacción xantoproteica es normal, pues salvo anuria absoluta no existe retención de sustancias aromáticas.

La disminución significativa del BUN o del nivel sérico de la urea:

Sólo se observa en algunas alteraciones. Además de una mala nutrición, la ingesta alta de líquidos o la administración excesiva de líquidos por vía intravenosa en presencia de función renal normal desembocarán en un disminución del BUN, puesto que se reabsorberá en los tubos renales una cantidad relativamente pequeña de urea.

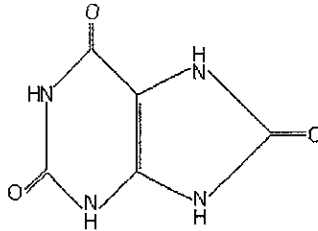
La tendencia hacia una disminución del BUN durante el embarazo probablemente es el resultado de un aumento del filtrado glomerular.

Por otra parte, la enfermedad hepática grave puede provocar reducción de la síntesis de la urea debido a la menor actividad de su ciclo.^{5,7}

Acido úrico

Propiedades Físicas y Químicas:

Acido úrico, 8 hidroxixantina.
Fórmula molecular: $C_5H_4N_4O_3$
Peso molecular: 168.11 Daltons
Clase química: purina



Ac Úrico

Fig 3. Estructura del ácido úrico.

La primera reacción aplicada para la determinación del ácido úrico (Fig 3) en sangre fue realizada en 1912, en la cual el ácido úrico reaccionaba con el ácido fosfotúngstico en medio alcalino dando como resultado la formación azul de tungsteno. Este método fue modificado aislando el ácido úrico mediante la formación de su sal de magnesio, amonio, cuprosa o cúprica.

Con la finalidad de mejorar la especificidad de las técnicas mencionadas se ha empleado la enzima Uricasa.^{22,43}

Significancia Clínica

El ácido úrico es el producto principal del catabolismo de las purinas en el hombre, y se forma a partir de la xantina por acción Xantinoxidasa. Las nucleoproteínas están presentes en todas las células y las purinas son producto de su degradación, dos purinas, adenina y guanina, son importantes constituyentes de los ácido nucleicos, el ADN y el RNA, y de nucleótidos libres tales como el trifosfato de adenosina (ATP), monofosfato de adenosina cíclico (C-AMP o AMP_c) y trifosfato de guanosina (GTP). La Xantina y la hipoxantina son otras purinas del cuerpo.

Las purinas pueden ser sintetizadas por el cuerpo o bien pueden ser ingeridas, algunos comestibles contienen una cantidad inusual de material nuclear tales como en el hígado y páncreas. Las serias consecuencias del metabolismo anormal del ácido úrico depende en parte de la insolubilidad del ácido úrico y monurato de sodio lo que conduce a la formación de cristales en el hígado y en el tracto urinario.⁷

Los uratos son el producto final del catabolismo de las bases púricas, debido a su pKa inferior al pH plasmático, el ácido úrico se encuentra en el plasma bajo la forma de urato monosódico, su unión a las proteínas es débil y se elimina a través de la orina. Los uratos son muy poco solubles en la sangre, por lo que un exceso puede producir un depósito de uratos en las articulaciones y en los tejidos ^{5,7,52,53}

Los niveles de ácido úrico se encuentran elevados en:

Gota. La gota es una enfermedad clásica familiar (se hereda) caracterizada por hiperuricemia (incremento de ácido úrico en la sangre) y depósitos de cristales de urato monosódico alrededor de las articulaciones. Las determinaciones de ácido úrico en suero son ordenadas habitualmente para propósitos de monitorear la gota actual o potencial en pacientes con artritis. Hay evidencia que el aumento de los niveles de ácido úrico puede deberse a una sobreproducción o baja excreción ^{7,52,53}

Hiperuricemias. Las primarias son consecuencia de alteraciones enzimáticas; las secundarias son consecuencia de un régimen hiperpurínico, de una alteración de la eliminación urinaria o de diversas afecciones relacionadas con un hipercatabolismo de las purinas.⁷

Destrucción de una cantidad inusual de tejido rico en ácido nucleico, tales como leucemias, policitemia (incremento en el número de células rojas) y en una neumonía ^{7,52}

Disminución de los niveles de Acido úrico:

De menor valor clínico, según se creía, pero recientemente (1979) se ha comprobado una mayor gravedad y peor pronóstico en los enfermos con procesos sépticos intraabdominales que presentaban hipouricemia con anterioridad.

Por hemodilución. En este caso puede tratarse de un síndrome de secreción inadecuada excesiva de hormona antidiurética y se acompaña de hiponatremia.

Por producción disminuida de ácido úrico. Déficit en xantino-oxidasa (xantínuria hereditaria) o deficiencia en PP-ribosa-P-sintetasa o en purina-nucleósido-fosforilasa. Hiperfosfatasa idiopática. Porfiria aguda intermitente.

Por eliminación renal aumentada. Aumento en la filtración glomerular, diuresis osmótica: (diabetes mellitus, glucosa i.v.,

Efecto hormonal: gestación, crecimiento.

Trastornos a nivel tubular: aislado para ácido úrico (mutación dalmata), específico para ácido úrico y calcio (de Vries). Generalizados: síndrome de Falconi, enfermedad de Hartnup, enfermedad de Wilson, galactosemia, cistinosis.

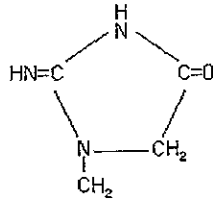
Efecto uricosúrico de mecanismo no precisado: por medicamentos (probenecid, benzodiarona, zaxazolamina, benzidamina, pirazolonas (fenilbutazona, sulfipirazona). También por esteroides y aspirina en altas dosis, diacepóxidos, yoduro potásico, glicerilguayacolato, metales pesados, etc ⁴⁵

Productos biológicos: bilirrubinas, pirimidinas, hormona tiroidea. Ciertas enfermedades: tumores malignos sólidos (especialmente carcinomas pulmonares, pero también mieloma, carcinoma medular de tiroides, etc.), leucemia aguda mieloblástica, linfoma (Hodgkin y otros).

Creatinina

Propiedades Físicas y Químicas.

Creatinina, 2-Imino-1-metil-4-Imidazolidona.
Fórmula molecular: $C_4H_7N_3O$
Peso molecular: 113.12 Daltons
Clase química: metabolito producto final
de la creatina



Creatinina

Fig 4. Estructura de creatinina.

El método de Jaffé para análisis de creatinina (Fig 4) se describió por primera vez en 1886.⁵⁵ Se ha utilizado numerosos materiales para aumentar la especificidad de la reacción de Jaffé, sobre todo materiales porosos pero el método cinético ha ganado popularidad con la disponibilidad de instrumentos capaces de efectuar lecturas exactas de absorbancia a intervalos precisos, altamente reproducibles.⁵⁶

Significancia Clínica.

La creatina esta involucrada en el almacenamiento de energía en el músculo esquelético y otros tejidos. La creatina es sintetizada en el hígado a partir de tres aminoácidos para ser trasportada posteriormente por la sangre al músculo. Ahí la enzima *creatinin fosfocinasa (CPK)* cataliza la reacción de creatinina con ATP para formar fosfocreatina. La fosfocreatina contiene un enlace fosfato de alta energía el cual sirve como un mecanismo de almacenamiento de energía. La creatinina es un producto catabólico final y un anhídrido de la creatina (o fosfocreatina) producido por la pérdida de agua (o ácido fosfórico) de la molécula en una reacción irreversible. La Creatinina no es reutilizada, por lo tanto es excretada del cuerpo por la vía urinaria, es formada en una cantidad constante la cual es proporcional a la masa de la musculatura corporal ^{7,5,57}

Una simple determinación de creatinina en suero puede utilizarse como un *indicador cualitativo y semicuantitativo de daño en la función renal*. Una información más cuantitativa con respecto a lo extenso del daño renal, específicamente al mecanismo de filtración, puede ser obtenido a través del uso de la prueba de aclaramiento de creatinina.^{7,45}

La Creatinina esta presente en la ultrafiltración del plasma la cual es llevada a cabo por los glómerulos del riñón. La creatinina filtrada no es reabsorbida por los túbulos renales. Una pequeña cantidad es adicionada a la orina por el proceso de secreción tubular.^{7,57}

El valor obtenido para el aclaramiento de la creatinina correlaciona bastante bien con una medición más exacta que es proporción de filtración glomerular (GFR). Existe, por supuesto un error significativo debido al hecho de que algo de creatinina encontrada de esta manera en orina es debida a secreción tubular en lugar de filtración.^{7,57}

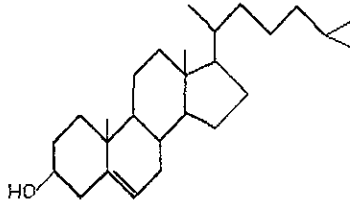
Como se mencionó anteriormente la determinación de Creatinina es principalmente realizada para evaluar la función renal; a este respecto, tiene varias ventajas sobre la determinación de urea (BUN), ya que el nivel de creatinina en plasma es relativamente independiente de la ingesta de proteína y de agua, la proporción de producción de orina y ejercicio, lo que hace que su producción sea constante en un individuo determinado. Por lo tanto, una elevación en el nivel de creatinina en plasma deberá representar una excreción baja, como por ejemplo en daño renal.^{5,7,8}

La concentración sérica o plasmática de la creatinina y su excreción urinaria aumentan notablemente después de necrosis o atrofia del músculo esquelético como traumatismo, distrofia musculares de progresión rápida, poliomieltis, esclerosis lateral amiotrófica, amiotonía congénita, miastenia gravis e inanición.^{8,45} El aumento del nivel de creatinina también se asocia con hipertiroidismo, y acidosis.

Colesterol

Propiedades Físicas y Químicas

Colesterol, coles-5-en-3-beta-ol.
Fórmula molecular: $C_{27}H_{46}O$
Peso molecular: 386.64 Daltons
Clase química: esteroil, lípido



Colesterol

Fig 5. estructura del colesterol

La determinación de colesterol total (Fig.5) incluye las formas libres y esterificadas del esteroide. En suero o plasma, dos tercios del colesterol total se encuentran en la forma esterificada y el resto en la forma libre. Existen varios métodos como el de:

* Abell y col.⁵⁹ ,

* Acido-sal de hierro,

* Acido p-toluensulfónico (p-TSA),

los cuales llevan a cabo la reacción de Liebermann-Burchard, sin embargo el método de punto final enzimático es más exacto, fácil de trabajar y automatizable.^{22,43,60,61}

Significancia Clínica.

Los lípidos se clasifican generalmente como sustancias orgánicas insolubles en agua pero solubles en los solventes orgánicos. Los principales lípidos del plasma humano son el colesterol, los ésteres del colesterol, los triglicéridos, los fosfolípidos y los ácidos grasos no esterificados. Los lípidos son transportados en el plasma y otros compartimientos extracelulares del cuerpo en forma de lipoproteínas, que son complejos macromoleculares compuestos de un núcleo lipídico hidrófobo, un fosfolípido hidrófilo y una superficie proteica ^{7,8,22}

El colesterol es un alcohol esteroide no saturado, importante componente estructural de las membranas celulares y un precursor para la biosíntesis de los ácidos biliares y las hormonas esteroideas. En los seres humanos, del 60 al 70% de colesterol es transportado por lipoproteínas de baja densidad (LDL), del 20 al 35%, por lipoproteínas de alta densidad (HDL) y del 5 al 12%, por lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). El colesterol y los triglicéridos son lípidos plasmáticos de máximo interés a la hora de tratamiento de las alteraciones de las lipoproteínas.^{8,22}

Enfermedades asociadas a un nivel de colesterol aumentado:

Aterosclerosis. Los médicos están interesados principalmente en la relación que existe entre el aumento del colesterol y la aterosclerosis. Esta es una lesión arterial caracterizada por el engrosamiento de la íntima debido a acúmulos localizados de lípidos principalmente colesterol libre, conocidos como ateromas. La gran importancia clínica de la aterosclerosis se debe a su predilección por las arterias coronarias, cerebrales y periféricas.^{7,62}

Hipotiroidismo. Una elevación de colesterol es común en pacientes con marcada reducción en los niveles de la hormona tiroidea. Esta observación puede ser de valor en la explicación de un valor alto de colesterol inesperado o en el seguimiento o tratamiento de la enfermedad.^{7,62}

Enfermedades del hígado. El colesterol en suero está incrementado en pacientes con enfermedades en el hígado las cuales están acompañadas de obstrucción del flujo de la bilis al hígado. En hepatitis, cirrosis y cáncer del hígado el colesterol en suero no se incrementa.^{7,62}

Necrosis. En ciertas enfermedades del riñón en las cuales grandes cantidades de proteínas se pierden por orina, el nivel de colesterol puede alcanzar valores muy altos.²⁹

Diabetes Mellitus. Los pacientes con esta enfermedad frecuentemente presentan el nivel de colesterol incrementado, pero que no es tan marcado como el incremento de los triglicéridos en suero.²⁹

Enfermedades asociadas con un nivel de colesterol disminuído:

El colesterol en el plasma tiende a descender durante la inanición y como resultado de prolongadas enfermedades debilitantes.^{7,29}

El Hipertiroidismo. (exceso de la actividad de la glándula tiroides) también reduce el nivel de colesterol en suero, pero este cambio no es de significancia diagnóstica. En un desorden heredado caracterizado por una ausencia de lipoproteínas -beta, el nivel de colesterol es extremadamente bajo y puede ser considerado como patológico. Esta enfermedad está acompañada de anormalidades neurológicas y anormalidades en la absorción de grasa por el intestino.²⁹

Planteamiento del problema

En México como en todo el mundo la preservación de la calidad en el laboratorio de análisis clínicos es muy importante, ya que nos permite asegurar la obtención de resultados de buena calidad, para ello la preservación incluye tres etapas.

Fase preanalítica: Asegura que se efectúen con buena calidad todos los procedimientos anteriores a la prueba tanto dentro como fuera del laboratorio, en esta fase es de suma importancia, efectuar las pruebas en orden correcto, preparación del paciente, identificación correcta de la muestra, recolección adecuada de la muestra, transporte de la muestra en el momento correcto y condiciones adecuadas dentro de los límites de tiempo que marca el laboratorio, técnicas correctas de centrifugación y separación de las células del plasma o suero de ser necesario.

Fase analítica: Dentro de esta fase se encuentran los programas de control de calidad interno y externo para preservar la calidad analítica, lo cual requiere que los reactivos estén bien etiquetados, la calibración de los dispositivos para pipetear, el mantenimiento preventivo de los equipos y su calibración, verificación periódica de la temperatura de las unidades de refrigeración o calentamiento, verificación periódica de la precisión de las velocidades de centrifugación y dispositivos para medir el tiempo, verificación periódica de los manuales de procedimientos, los cuales deberán estar completos, corregidos y al día.

Fase postanalítica: No por ser la última fase es de menos importancia que las antes mencionadas, ya que en ésta se lleva a cabo el proceso para verificar la calidad de todos los procedimientos cuando el reporte sale del laboratorio y queda en manos del médico o del profesionalista al cuidado de la salud

Además de utilizar rangos de referencia correctos, las áreas de preservación de la calidad postanalítica incluye la verificación de reportes finales, revisión de los resultados, procedimientos para informar al médico etc.

La preservación de la calidad en el laboratorio clínico incluye todas las acciones que ahí se llevan a cabo para asegurar la obtención de resultados de buena calidad, resulta una premisa básica del control de calidad que los valores enviados por el laboratorio correspondan a los valores correctos o esperados, asegura la calidad que se realiza antes de introducir un nuevo método es en proceso de preservación de calidad que se realiza antes de introducir un nuevo procedimiento al laboratorio. Si se detecta algún cambio en la competencia analítica después de establecer un nuevo método con el fin de volver a verificar el desempeño óptimo.

Por lo tanto, la evaluación del método forma parte importante de la preservación de la calidad preanalítica y analítica.

En Estados Unidos, Canadá y otros países contemplan legislaciones que son muy claras en cuestión de la regulación de los laboratorios clínicos, ejemplo de estos son el CLIA de Estados Unidos, ISO 9000 en Europa y otras organizaciones

En México no existen leyes que legislen y normen la evaluación de la calidad para el área clínica como lo existe en la Industria Farmacéutica, ya que en todos los Laboratorios Clínicos se hace poco énfasis sobre la evaluación de sus métodos y la importancia que esto conlleva, ya que nos permite ser más competitivo en un mercado nacional e internacional.

Con la entrada de México al Tratado de Libre Comercio y la llegada a nuestro país de laboratorios extranjeros con acreditación internacional, es necesario que se establezca una legislación que promueva la calidad de todos los laboratorios para que se pueda tener una competencia más leal.

Como se observa uno de los puntos claves de la mejoría de la calidad es la evaluación de los métodos. Por tal motivo, con el presente trabajo se llevará a cabo la evaluación de cinco pruebas rutinarias en Química Clínica en el equipo Hitachi 717, como parte esencial de la preservación de la calidad en el laboratorio clínico al ser un equipo de reciente introducción en el trabajo de laboratorio

Objetivos.

Determinación de los cinco analitos Glucosa, Urea, Ac. Úrico, Creatinina y Colesterol con el equipo Hitachi 717.

Determinación de la precisión, exactitud, linealidad, rango de especificidad, límite de detección, sensibilidad y especificidad, de cada una de las pruebas anteriormente mencionadas en el Hitachi 717.

Detección de la estabilidad de las muestras a temperatura ambiente y a 8 °C previamente centrifugadas (suero), para las determinaciones de los cinco analitos antes mencionados en el equipo Hitachi 717.

Comparación de los resultados de las determinaciones mencionadas en los equipos Hitachi 717 y el VP Analyzer (equipo anteriormente utilizado en el laboratorio).

Hipótesis

Para asegurar la calidad en un laboratorio clínico, es necesario que todos los procedimientos y equipos se encuentren validados, sobre todo cuando se trata de un sistema nuevo. Los equipos deben tener una precisión, exactitud, linealidad, especificidad analítica y límite de detección por arriba del 90% de confianza y una interferencia analítica menor al 5%, característica que deberá cumplir el Hitachi 717 para que pueda sustituir al equipo empleado en la actualidad.

Reactivos.

Reactivos de Glucosa GOD-PAP	Lakeside
Reactivos Glucosa hexoquinasa	Abbott
Reactivo de Urea test UV-Cinético	Abbott
Reactivo de Urea test UV-Cinético	Lakeside
Reactivo de Ac. Urico PAP	Abbott
Reactivo de Ac. Urico Plus	Lakeside
Reactivo de Creatinina Método de Jaffé con blanco de twin	Lakeside
Reactivo de Creatinina Método de Jaffé	Abbott
Reactivo de Colesterol CHOD-PAP	Abbott
Reactivo de Colesterol CHOD-PAP	Lakeside
Calibrador para sistema automatizado (Hitachi)	Lakeside
Precinorm U (control normal)	Lakeside
Precipath U (control anormal)	Lakeside
Estandares de Glucosa/Bun	
de 100 mg/dL	Abbott
300 mg/dL	
500 mg/dL	
Estandares de Creatinina	
de 2 mg/dL	Abbott
6 mg/dL	
10 mg/dL	
Estandares de Acido Urico	
de 4 mg/dL	Abbott
6 mg/dL	
9 mg/dL	
Estandares de Colesterol	
de 25 mg/dL	Abbott
50 mg/dL	
100mg/dL	
300 mg/dL	
400mg/dL	

Estandares de Bun de 10 mg/dL	Abbott
30 mg/dL	
50 mg/dL	
Solución salina 0.90%	Merck
Hidróxido de sodio 1N	Merck
Detergente (Highterger 4% y concentrado)	Lakeside
Etanol	Merck
Hipoclorito de sodio	Merck

EQUIPO

Equipo automatizado Hitachi 717	Boehringer-Mannheim
VP Analyzer	Abbott
Equipo de ósmosis inversa	US Filter
Centrifuga	Beckman
Refrigerador	Magnavox
Estufa	General Electric
Bomba de agua de ¾ caballo	Simens

MATERIAL

Celdas de reacción para Hitachi	Hitachi
Celdas de reacción para VP	Abbott
Copillas para Hitachi	Hitachi
Copillas para VP	Abbott
Pipeta volúmetrica de 3ml	Pyrex
Pipeta volúmetrica de 5ml	Pyrex

Pipeta automática de 40 a 200 microlitros	Labsystems
Pipeta automática de 2 a 10 mL	Labsystems
Adaptador para copillas de Hitachi	Hitachi
Puntillas universales de 200 microlitros	Labsystems
Puntillas para 10 mL	Labsystems
Dosificador de 10 mL	Oxford
Accesorios para Hitachi (papel impresión, disketts, cinta para impresora)	
Accesorios para VP (papel para impresión, cinta para máquina de escribir)	
Papel parafilm	
Gasas	
Hisopos	
Papel adsorbente	
Aplicadores de madera	
Tubos Vacutainer de 8 y 10 ml con gel SST	Becton Dickinson
Adaptador para tubos Vacutainer	Becton Dickinson
Agujas	Becton Dickinson

Determinación de la glucosa en el HITACHI 717.

Fundamento y reacción

Método y Reacciones Químicas	Valor de Referencia
<p>Método GOD-PAP (Glucooxidasa)</p> $\text{Glucosa} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{GOD}} \text{gluconato} + \text{H}_2\text{O}_2$ $2 \text{H}_2\text{O}_2 + \text{amino-4-aminofenazona} + \text{fenol} \xrightarrow{\text{POD}} (\text{mono-imino-p-benzoquinona})\text{-4 fenazona} + 4 \text{H}_2\text{O}$ <p>Técnica de punto final</p> <p>Longitud de onda de medida 340 nm.</p>	<p>60-110 mg/dL</p>

Cálculos⁴⁷

La calculadora del analizador utiliza la medición de la absorbancia para calcular la concentración de la glucosa como sigue:

Para analizadores BM/Hitachi 717.

$$C_x = K(A_x - A_b) C_b$$

Donde.

C_x = Concentración de la muestra.

K = Factor de la concentración (Determinado durante la calibración)

A_x = Media de las absorbancias de la muestra + R_1 + R_2 leídas durante los ciclos designados menos la media de la absorbancia de la muestra + R_1 leída durante los ciclos designados. **

A_b = Media de las absorbancias del STD 1 (Blanco/Calibrador 1) + R_1 + R_2 leidas durante los ciclos designados menos la media de la absorbancia del STD 1 (Blanco/Calibrador 1) + R_1 leida durante los ciclos designados.**

C_b = Concentración del STD 1 (Blanco/Calibrador 1).

**Corrección del volumen muestra/reactivo para

$d = (\text{Volumen muestra} + \text{la lectura } R_1) / (\text{Volumen muestra} + \text{la lectura } R_1 + \text{la lectura de } R_2)$.

Para convertir unidades convencionales al Sistema Internacional se multiplican las unidades convencionales por 0.0555.

$\text{mg/dL} \times 0.0555 = \text{mmol/L glucosa}$.

Muestra

A. Recolección y preparación de la muestra 7.48

Suero, plasma heparinizado o con EDTA.

Cuando no se emplea conservador es necesario separar el suero o el plasma de las células en la hora siguiente a la toma de la muestra de sangre. Una vez separados, la concentración de glucosa se estabiliza hasta por ocho horas a 25°C y por 72 horas a 4°C si la muestra está libre de células y contaminantes bacterianos.

Si se añade un inhibidor de glucólisis (NaF, KF), los iones fluoruro evitan la glucólisis inhibiendo la enolasa y la fructosa-1,6-difosfatasa, quedando garantizada una estabilidad de 24 horas a +15-25°C.

La estabilidad en suero/plasma a +4°C en recipientes cerrados es de 7 días.

Orina (24 Hrs).

Para la recolección de la orina se recomienda que al envase se le añada NaOH 1N. Para una dilución manual, diluir la orina con NaCl al 0.9% o bien con agua desionizada o destilada y multiplicar por el apropiado factor de dilución 48

Reactivos

Contenido de los reactivos:

Solución de trabajo R₁.

Contiene Tampón: 200 mmol/L, pH 7.5: GOD mayor o igual a 11 U/ml: POD mayor o igual a 0.02 u/ml: 4-aminofenazona: 0.77 mmol/L: fenol: 11 mmo

Calibradores ⁴⁹

Blanco o Calibrador 1:

Contiene Cloruro de sodio al 0.9%.

Calibrador 2:

Calibrador de suero (Multicalibrador para sistema automatizado).

NOTA: Los componentes adquiridos en el equipo de reactivos estan diseñados para utilizarse como una unidad integral. No se debe de mezclar los componentes de varios lotes, ni preparados a diferente tiempo.

B. Precauciones y Advertencias:

Para uso de diagnóstico "In Vitro". Nunca aspire por la pipeta con la boca. Ejercite las precauciones normales requeridas para el manejo de todos los reactivos en el laboratorio.

ADVERTENCIA. CORROSIVO La solución de trabajo 1 contiene fenol y azida sódica como conservador. Es tóxico si se llega en contacto con la piel o es ingerido en pequeñas concentraciones provoca náuseas, vómito, colapso circulatorio, parálisis, convulsiones y coma la orina cambia de color de verde oscuro a un color grisáceo

Provoca cauterización en la piel y mucosa y si hay salpicadura lavar con abundante agua y en caso de caer en los ojos lavar y consultar a un oftalmólogo. La azida sódica al reaccionar con algunos metales como plomo o aluminio se convierte en potencialmente explosivo.⁴⁸

C. Preparación de los reactivos, Almacenaje y Estabilidad.⁴⁸

Preparación de reactivos.

1. Solución de trabajo R₁: Utilizar el frasco 1 ya que esta listo para su uso.

Almacenamiento y estabilidad.

Los reactivos de la glucosa son estables de 15-25 C°. por 7 días una vez que son abiertos sin refrigerar. Para la estabilidad de los componentes que no han sido abiertos, referirse a la etiqueta del bote para verificar la fecha de caducidad: Abierto y en uso de 28 días de 2-10°C. Estabilidad en el aparato 4 semanas.

Conservar la solución protegida de la luz. El almacenamiento más prolongado de pequeños volúmenes del reactivo destapados no es recomendable.

Determinación de Urea en el HITACHI 717.

Fundamento y reacción

Método y Reacciones Químicas	Valor de Referencia
<p>Método Enzimático</p> $\text{Urea} + \text{H}_2\text{O} + 2\text{H} \xrightarrow{\text{Ureasa}} \text{CO}_2 + 2\text{NH}_4$ $\text{NH}_4 + \text{alfa-cetoglutarato} + \text{NADH} \xrightarrow{\text{GLDH}} \text{L-glutamato} + \text{NAD} + \text{H}_2\text{O}$ <p>Técnica de punto final</p> <p>Longitud de onda de medida 340 nm.</p>	<p>19-41 mg/dL</p>

Cálculos:⁴⁷

La calculadora del analizador utiliza la medición de la absorbancia para calcular la concentración de la urea como sigue:

Para analizadores BM/Hitachi 717.

$$C_x = [K(\Delta A_x - \Delta A_b) + C_b]$$

Donde

C_x = Concentración de la muestra.

K = Factor de la concentración (Determinado durante la calibración).

ΔA_x = Cambio en la absorbancia de la muestra por minuto + la lectura R_1 + la lectura de R_2 durante los ciclos designados menos el cambio en la absorbancia de la muestra + la lectura de R_1 durante los ciclos designados**.

ΔA_b = Cambio en la absorbancia del STD 1 por minuto + la lectura R_1 + la lectura de R_2 durante los ciclos designados menos el cambio en la absorbancia del blanco + la lectura de R_1 durante los ciclos designados.**

C_b = Concentración del STD 1 (Blanco/Calibrador).

**Corrección del volumen muestra/reactivo para

$d = (\text{Volumen muestra} + \text{la lectura } R_1) / (\text{Volumen muestra} + \text{la lectura } R_1 + \text{la lectura de } R_2)$.

Muestra

A. Recolección y preparación para el análisis ^{7.50}

Suero: Recolectado por la técnica estándar de venopunción.

Plasma: Utilizar plasma heparinizado no hemolizado. No usar Heparinato de amonio.

Orina: Recolectar la orina sin conservadores. Refrigerar durante la recolección. Para una dilución manual diluir la orina con NaCl al 0.9% o bien agua desionizada o destilada y multiplicar por el factor de dilución apropiado.

Almacenamiento: El suero o plasma es estable por 3 días de 2-8 °C.. La orina es estable por 4 días de 2-8 °C.

Aunque la urea es estable en el plasma, suero y orina durante varios días bajo refrigeración, las muestras, especialmente la orina, deberán valorarse a las pocas horas para evitar la contaminación bacteriana, que podría provocar una pérdida rápida de la urea.

Reactivos

*Contenido de los reactivos:*⁵⁰

Reactivo R_1 GLDH/NADH/alfa-cetoglutarato.

Contiene una concentración aproximada de 1650 U/L GLDH (EC. 1 4.1.3, hígado, 30°C)

352 mmol/L de NADH (levadura)

6.95 mmol/L acetoglutarato

Reactivo R₂ Ureasa.

Contiene una concentración aproximada de

36.70 KU/L Ureasa (EC 3.5.1.5; frijol de soya); 30°C).

Calibradores⁴⁹

Blanco o Calibrador 1:

Contiene Cloruro de sodio al 0.9%.

Calibrador 2:

Calibrador de suero (Multicalibrador para sistema automatizado).

NOTA Los componentes adquiridos en el equipo de reactivos están diseñados para utilizarse como una unidad integral. No mezcle los componentes de varios lotes, ni preparados a diferente tiempo.

*B. Precauciones y Advertencias:*⁴⁹

Para uso de diagnóstico "In Vitro". Nunca aspire la pipeta con la boca. Ejercite las precauciones normales requeridas para el manejo de todos los reactivos en el laboratorio

ADVERTENCIA. Los reactivos 1 y 2 de la marca comercial Boehringer Mannheim contienen azida sódica como conservador. Evite la ingestión y el contacto con la piel y las mucosas. En caso de contacto lavar el área afectada en el chorro de agua de la llave. Consiga atención médica en caso de ingesta o salpicaduras en ojos. La azida sódica puede reaccionar con plomo o recubiertas de plomo los cuales forman potencialmente metales explosivos.

Cuando se disponga de tales reactivos, siempre lave con grandes cantidades de agua para prevenir la concentración de azida. Limpie la superficie de metales con 10% de hidróxido de sodio.

C. Preparación de los reactivos, Almacenaje y Estabilidad.

Preparación de reactivos.⁶

1. Solución de trabajo R₁:

Reconstituir el contenido del frasco 1 con la cantidad apropiada de agua desionizada o destilada libre de amonio. Mezcle ligeramente para disolver el contenido del frasco.

2. Solución de trabajo R₂:

Reconstituir el contenido del frasco 2 con la cantidad apropiada de agua desionizada o destilada libre de amonio. Mezcle ligeramente para disolver, durante la reconstitución, la solución podrá formar pequeñas burbujas. Evitar su presencia antes de utilizarla en el analizador.

Los reactivos 1 y 2 deberán utilizarse combinados para llevar a cabo la determinación del urea..

Almacenamiento y estabilidad.⁴⁹

Los reactivos de la urea son estables de 2 a 8 °C Para la estabilidad de los componentes que no han sido abiertos, referirse a la etiqueta del frasco para verificar la fecha de caducidad. Deseche las soluciones con visible crecimiento microbiano.

Solución de trabajo R₁: Abierto y en uso de 3 semanas de 2-12 °C o bien 6 días de 15-25°C cuando se proteje de la luz y de la contaminación por microorganismos

La estabilidad en el aparato aproximadamente a 10°C es 3 semanas.

Solución de trabajo R₂: Abierto y en uso es de 3 semanas de 2-12 °C o bien 6 días de 15-25°C cuando se proteje de la luz y de la contaminación por microorganismos. La estabilidad en el aparato aproximadamente a 10°C es 3 semanas.

Determinación del ácido úrico en el HITACHI 717

Fundamento y reacción.

Método y Reacciones Químicas	Valor de Referencia
<p>Método Uricasa-POD (Enzimático)</p> $\text{Ac Úrico} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{Uricasa}} \text{Alantoína} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$	<p>F: 1.9-6.8 mg/dL</p> <p>M: 3.8-8.7 mg/dL</p>
$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{TOOS}^* + 4\text{-aminofenazona} \xrightarrow{\text{Peroxidasa}} \text{Complejo colorido imino-quinona} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{HBr}$ <p>*TOOS = N-etil-N-(2 hidroxí-3-sulfoxido)-3-metilalanina</p> <p>Técnica de punto final</p> <p>Longitud de onda de medida 570 nm.</p>	

Cálculos

La calculadora del analizador utiliza la medición de la absorbancia para calcular la concentración del ácido úrico como sigue:

Para analizadores BM/Hitachi 717.

$$C_x = K(A_x - A_b) C_b$$

Donde:

C_x = Concentración de la muestra.

K = Factor de la concentración (Determinado durante la calibración).

A_x = Media de las absorbancias de la muestra + R_1 + R_2 leídas durante los ciclos designados menos la media de la absorbancia de la muestra + R_1 leída durante los ciclos designados.**

A_b = Media de las absorbancias del STD 1 (Blanco/Calibrador 1) + R_1 + R_2 leídas durante los ciclos designados menos la media de la absorbancia del STD 1 (Blanco/Calibrador 1) + R_1 leída durante los ciclos designados.**

C_b = Concentración del STD 1 (Blanco/Calibrador 1).

**Corrección del volumen muestra/reactivo por

$d = (\text{Volumen muestra} + \text{la lectura } R_1) / (\text{Volumen muestra} + \text{la lectura } R_1 + \text{la lectura de } R_2)$.

Muestra:

A. Recolección y Preparación para el análisis:^{7,52}

Suero: Recolectar suero no hemolizado por técnicas de venopunción.

Plasma: Se recomienda el uso de anticoagulantes como el EDTA o heparina para la recolección del plasma.

Orina (24 Hrs). Para la recolección de la orina se recomienda que al envase se le añada NaOH 1N. Para una dilución manual, diluir la orina con 0.9% de NaCl o bien con agua desionizada o destilada y multiplicar por el apropiado factor de dilución.

Almacenamiento. El ácido úrico es estable en suero o plasma por una semana a 2-8°C. Llevar a cabo el análisis lo más rápido posible.⁷

Reactivos

*Contenido de los reactivos*⁵²

Reactivo R_1

Contiene una concentración aproximada de 0.05 mol/L de Amortiguador de Fosfatos a pH 7.8, alcohol graso de eter poliglicol al 4.8%, 7 mmol de N-etil-N-

(2-Hidroxi-3-sulfopropil)-3-metilalanina, 5U/mL Ascorbato oxidasa (EC 1.10.3.3; Zucchini, 25°C).

Reactivo R₂ Enzimas/4-aminofenazona.

Contiene una concentración aproximada de 0.1 mol/L de Amortiguador de fosfato a pH 7.8, 0.30 mmol/L de Hexacianoferrato de potasio (II), 3mmol/L 4-Aminofenazona, ³ 0.5 U/mL de uricasa. (EC 1.7.3.3; *Aspergillus protophormiae*; 25°C), ³ 1 U/mL de peroxidasa (POD) (EC 1.11.1.7; Rábano; 25°C).

Calibradores⁴⁹

Blanco o Calibrador 1:

Contiene Cloruro de sodio al 0.9%.

Calibrador 2:

Calibrador de suero (Multicalibrador para sistema automatizado).

NOTA: Los componentes adquiridos en el equipo están diseñados para utilizarse como una unidad integral. No mezcle los componentes de varios lotes, ni preparados a diferente tiempo

B. Precauciones y Advertencias:

Para uso de diagnóstico "In Vitro". Nunca aspire la pipeta con la boca. Ejercite las precauciones normales requeridas para el manejo de todos los reactivos en el laboratorio.

ADVERTENCIA. Los reactivos 1 y 2 de la marca comercial Boehringer Mannheim contienen azida sódica como conservador. Evite la ingestión y el contacto con la piel y las mucosas. En caso de contacto, lavar el área afectada en el chorro de agua de la llave.

Consiga atención médica en caso de ingesta o salpicaduras en ojos. La azida sódica puede reaccionar con plomo o recubiertas de plomo los cuales forman potencialmente metales explosivos. Cuando se disponga de tales reactivos, siempre lave con grandes cantidades de agua para prevenir la concentración de azida. Limpie la superficie de metales con 10% de hidróxido de sodio.⁵⁴

C. Preparación de los reactivos, Almacenaje y Estabilidad.⁵²

Preparación de reactivos.

1. Solución de trabajo R₁: Utilizar el frasco 1 el cual esta listo para su uso.
2. Solución de trabajo R₂: Utilizar el frasco 2 el cual esta listo para su uso.

Los reactivos 1 y 2 deberán utilizarse combinados para llevar a cabo la determinación del ácido úrico.

Almacenamiento y estabilidad.

Los reactivos del ácido úrico son estables de 2 a 8 °C. Para la estabilidad de los componentes que no han sido abiertos, referirse a la etiqueta del frasco para verificar la fecha de caducidad. Desechar las soluciones si existe evidencia de una contaminación bacteriana.

Solución de trabajo R₁: Abierto y en uso 28 días de 2-12 °C protegido de la luz. Estabilidad en el aparato (aprox 10°C) por lo menos 1 mes, 2 semanas en el aparato sin refrigeración.

Solución de trabajo R₂: Abierto y en uso 28 días de 2-12 °C protegido de la luz. Estabilidad en el aparato (aprox 10°C) por lo menos 1 mes, 2 semanas en el aparato sin refrigeración.

Determinación de la creatinina en el HITACHI 717

Fundamento y reacción.

Método y Reacciones Químicas	Valor de Referencia
<p>Método de Jaffé sin desproteinización</p> <div style="text-align: center; margin: 10px 0;"> </div> <p style="text-align: center;">Creatinina + Ac. Pícnico → Complejo de Janowski</p> <p>Técnica cinética</p> <p>Longitud de onda de medida 505 nm.</p>	<p>0.5-1.7 mg/dL</p>

Cálculos⁴⁷

La calculadora del analizador utiliza la medición de la absorbancia para calcular la concentración de la creatinina como sigue:

Para analizadores BM/Hitachi 717.

$$C_x = [K(\Delta A_x - \Delta A_b) + C_b] - 0.3$$

Donde:

C_x = Concentración de la muestra.

K = Factor de la concentración (Determinado durante la calibración).

ΔA_x = Cambio en la absorbancia de la muestra por minuto + la lectura R_1 + la lectura de R_2 durante los ciclos designados menos el cambio en la absorbancia de la muestra + la lectura de R_1 durante los ciclos designados**.

ΔA_b = Cambio en la absorbancia del blanco por minuto + la lectura R_1 + la lectura de R_2 durante los ciclos designados menos el cambio en la absorbancia del blanco + la lectura de R_1 durante los ciclos designados.**

C_b = Concentración del blanco.

**Corrección del volumen muestra/reactivo por

$d = (\text{Volumen muestra} + \text{la lectura } R_1) / (\text{Volumen muestra} + \text{la lectura } R_1 + \text{la lectura de } R_2)$.

La concentración de la creatinina en orina de 24 hrs es determinada como sigue:

$$\frac{\text{Creatinina en mg/dL x orina de 24 hrs en litros}}{100}$$

Muestra:

A. Recolección y preparación para el análisis.^{5,7,55}

Suero: Recolectado por la técnica estándar de venopunción.

Plasma: Utilizar plasma con EDTA, heparinizado no hemolizado, los otros anticoagulantes interfieren con la prueba.

Orina: Recolectada sin conservadores. Para una dilución manual, diluir la orina con NaCl al 0.9% o bien agua desionizada o destilada y multiplicar por el factor de dilución apropiado.

Nota: Puesto que los eritrocitos contienen considerables cantidades de cromógenos no derivados de la creatinina, es preferible utilizar plasma y suero en lugar de sangre total para medir la creatinina.

Almacenamiento: El suero o plasma es estable por 24 hrs de 2-8 °C; congelados su periodo de almacenamiento es más largo. Evitar congelar y descongelar la muestra repetidamente. La orina es estable por 4 días de 2-8 °C. En congelación su periodo de almacenamiento es más prolongado, aproximadamente 30 días.

Debido a la fragilidad de la creatina a creatinina, se recomienda el uso de especímenes frescos. También es necesario mantener los especímenes a un pH de 7 durante su almacenamiento para evitar interconversiones.

Reactivos

*Contenido de los reactivos*⁵⁵

Solución de trabajo R₁ NaOH.

Contiene 0.2 mol/L de hidróxido de sodio en una mezcla amortiguadora.

Solución de trabajo R₂ Acido pícrico.

Contiene 25 mmol/L de ácido pícrico en una mezcla amortiguadora.

Calibradores⁴⁹

Blanco o Calibrador 1:

Contiene Cloruro de sodio al 0.9%.

Calibrador 2:

Calibrador de suero (Multicalibrador).

El valor del multicalibrador es igual a su contenido de creatinina más 0.3 mg/dL.

Este valor es el atribuido a las proteínas que no reaccionan específicamente.

NOTA: Los componentes adquiridos en el equipo están diseñados para utilizarse como una unidad integral. No mezcle los componentes de varios lotes, ni preparados a diferente tiempo.

B. Precauciones y Advertencias⁵⁵

Para uso de diagnóstico "In Vitro" Nunca aspire la pipeta con la boca. Ejercite las precauciones normales requeridas para el manejo de todos los reactivos en el laboratorio.

ADVERTENCIA. CORROSIVO. El frasco 1 contiene Hidróxido de sodio. En caso de contacto, coloque el área afectada en el chorro de agua. Consiga inmediatamente atención médica para ojos e ingesta. **PELIGRO. TOXICO.** El frasco 2 contiene ácido pícrico. En caso de contacto, coloque el área afectada en el chorro de agua. Consiga inmediatamente atención médica para ojos e ingesta.

C. Preparación de los reactivos, Almacenaje y Estabilidad⁵⁸

Preparación de reactivos.

1. Solución de trabajo R₁: Utilizar el frasco 1 (NaOH) ya que esta listo para su uso
2. Solución de trabajo R₂: Utilizar el frasco 2 (ácido pícrico) ya que está listo para su uso.

Los reactivos 1 y 2 deberán utilizarse combinados para llevar a cabo la determinación de la creatinina.

*Almacenamiento y estabilidad*⁵⁵

Los reactivos de la creatinina son estables de 15 a 25 °C. Para la estabilidad de los componentes que no han sido abiertos, referirse a la etiqueta del frasco para verificar la fecha de caducidad.

Solución de trabajo R₁: Abierto y en uso 21 días de 2-12 °C. Estabilidad en el aparato (aprox 10°C) 3 meses.

Solución de trabajo R₂: Abierto y en uso hasta la fecha de caducidad de 2-12 °C. Estabilidad en el aparato (aprox 10°C) 3 meses.

El almacenamiento más prolongado de pequeños volúmenes del reactivo destapados no es recomendable.

Determinación de Colesterol en el HITACHI 717.

Fundamento y Reacción

Método y Reacciones Químicas	Valor de Referencia
<p>Método CHOD-PAP (Enzimático)</p> <p>Esterasa de Colesterol + H₂O $\xrightarrow{\text{Colesterol esterasa}}$ Colesterol + R-COOH</p> <p>Colesterol + O₂ $\xrightarrow{\text{Colesterol oxidasa}}$ Δ^4-colestanona + H₂O₂</p> <p>H₂O₂ + cromógeno $\xrightarrow{\text{Peroxidasa}}$ Color</p> <p>Técnica de punto final</p> <p>Longitud de onda de medida 505 nm.</p>	120-199 mg/dL

Cálculos

La calculadora del analizador utiliza la medición de la absorbancia para calcular la concentración del colesterol como sigue:

Para analizadores BM/Hitachi 717.⁴⁷

$$C_x = K(A_x - A_b) C_b$$

Donde:

C_x = Concentración de la muestra.

K = Factor de la concentración (Determinado durante la calibración).

A_x = Media de las absorbancias de la muestra + R₁ + R₂ leídas durante los ciclos designados menos la media de la absorbancia de la muestra + R₁ leída durante los ciclos designados.

A_b = Media de las absorbancias del STD 1 (Blanco/Calibrador 1) + R₁ + R₂

leídas durante los ciclos designados menos la media de la absorbancia del STD 1 (Blanco/Calibrador 1) + R₁ leída durante los ciclos designados.**

C_b= Concentración del STD 1 (Blanco/Calibrador 1).

Muestra

A. Colección y preparación para el análisis.^{7,22,59}

Preparación del paciente: Ayuno 12-24 h. Con dieta controlada en grasas por dos semanas antes.

Suero: Recolectado por la técnica estándar de venopunción.

Plasma. Utilizar el plasma con EDTA o bien Heparina. No utilizar citrato, fluoruro u oxalato .

Si se utilizó EDTA, convertir el valor del plasma de acuerdo con el siguiente factor: Colesterol en suero = Colesterol en Plasma (EDTA) x 1.03¹³. Los niveles de colesterol pueden ser aproximadamente 3% menores a los niveles de suero cuando se utiliza EDTA como anticoagulante y no se realiza esta corrección.

Almacenamiento. El suero o plasma heparinizado o EDTA es estable por 6 días de 4-25°C o bien 4 meses a -20°C

Reactivos

*Contenido de los reactivos:*⁵⁹

Solución de trabajo R₁ Reactivo de colesterol.

Contiene 75 mmol/L amortiguador PIPES pH 6.8.

10 mmol/L de Mg⁺²

0.2 mmol/L de Cloruro de sodio

0.15 mmol/L de 4-aminofenazona

≥4.2mmol/L de Fenol

1% de alcohol graso de eter de poliglicol

≥0.5 U/mL de Esterasa de colesterol (EC 3.1.1.13; especies pseudomonas; 25°C.

≥0.15 U/mL de Oxidasa de colesterol (EC 1.1.3.6; E. coli; 25°C)

≥0.25 U/mL de Peroxidasa (POD) (EC 1.11.1.7; Peroxidasa de rábano; 25°C.)

Ingredientes que no reaccionan amortiguador, estabilizadores, preservativos.

Calibradores⁴⁹

Blanco o Calibrador 1:

Contiene Cloruro de sodio al 0.9%.

Calibrador 2:

Calibrador de suero (multicalibrador)

NOTA: Los componentes adquiridos en el equipo de reactivos están diseñados para utilizarse como una unidad integral. No mezcle los componentes de varios lotes, ni preparados a diferente tiempo.

B. Precauciones y Advertencias⁵⁹

Para uso de diagnóstico "in vitro" Nunca aspire la pipeta con la boca. Ejercite las precauciones normales requeridas para el manejo de todos los reactivos en el laboratorio.

ADVERTENCIA. CORROSIVO. El frasco 1 contiene fenol como conservador. Es tóxico si llega a tener contacto con la piel o es ingerido. En concentraciones pequeñas provoca náuseas, vómito, colapso circulatorio y en casos extremos parálisis, convulsiones y coma. Cambian la coloración de la orina de un negro humo a verde oscuro.

Causan cauterización de la piel y mucosas también se absorbe por la piel, y grandes proporciones puede ser fatal.^{43,59}

C. Preparación de los reactivos.⁵⁹

1. Solución de trabajo R₁: El contenido está listo para el uso. Antes del primer uso, mezclar agitando ligeramente.
2. Solución de trabajo R₂: (Técnica con SMS) o blanco con Twin. Es opcional, nos permite eliminar algunas interferencias o reducirlas como las bilirrubinas, etc.

*Almacenamiento y estabilidad.*⁵⁹

El reactivo del colesterol es estable de 2-8°C. Para la estabilidad de los componentes que no han sido abiertos, referirse a la etiqueta del frasco para verificar la fecha de caducidad.

Solución de trabajo R₁: Abierto y en uso de 28 días de 2-12 °C o bien de 20-25 °C por 7 días cuando ésta es protegida de la luz y la contaminación bacteriana. La estabilidad en el aparato aproximadamente a 10°C es de 1 mes.

El almacenamiento más prolongado de pequeños volúmenes del reactivo destapado no es recomendable

Diseño de la Investigación.

Tipo de estudio:

Observacional,
Transversal,
Prospectivo

Población

La población sujeta al estudio fue de 2000 sueros tanto patológicos como normales de pacientes, seleccionados al azar que acudieron al laboratorio a realizarse pruebas de alguno o de todos los analitos en estudio, procedentes de las 15 receptorias con las que cuenta la empresa, ubicadas dentro de la zona metropolitana de la Ciudad de México.

Criterios de Inclusión: Se incluyeron todos los sueros de pacientes, haciendo caso omiso con respecto a edad y sexo.

Criterios de Exclusión: No se tomaron en cuenta las muestras que en su orden de análisis no solicitaron alguna de las pruebas de estudio.

Criterios de Eliminación: Las muestras que presenten hemólisis, ictericia, lipemia, post-prandiales y curva de tolerancia a la Glucosa, no se tomaron en cuenta en el presente estudio, así como las muestras que no contengan la cantidad específica del analito en estudio.

Variables.

Variable dependiente: Concentración del analito. (Glucosa, Urea, creatinina, Ac. Úrico y Colesterol) en escala de medición cuantitativa de razón.

Variable Independiente: Hitachi 717 (Boehringer-Mannheim), VP Analyser (Abbott) en escala de medición cualitativa nominal.

Metodología

Fase I. Recolección de las muestras.

Se seleccionaron 2000 muestras de pacientes sin importar edad ni sexo, y que presentaron alguna alteración en los siguientes analitos: Glucosa, Urea, Creatinina, Acido Urico y Colesterol.

Fase II. Una vez puesto en condiciones optimas los equipos se procesaron las muestras. Posteriormente se hizo un pool con los suero de diferentes concentraciones para cada analito en estudio y se hicieron alícuotas de 200 microlitros, las cuales se congelaron por un periodo de 1 mes hasta la siguiente etapa.

Fase III. Para la determinación de la linealidad se tomarón en consideración aquellas concentraciones de decisión médica así como el valor inferior y superior del rango de linealidad que indica el fabricante para cada analito en cuestión

Para la Glucosa (50mg/dL, 100mg/dL,120mg/dL, 250mg/dL, 300mg/dL, 440mg/dL).

Urea (10mg/dL, 30mg/dl,50mg/dL, 100mg/dL, 200mg/dL, 330mg/dL).

Ac Urico (1.5mg/dL, 2mg/dL, 5mg/dL, 7mg/dL, 12mg/dL, 14mg/dL).

Creatinina (0.5mg/dL, 1mg/dL, 1.5mg/dL, 2mg/dL, 4mg/dL, 12mg/dL, 24mg/dL).

Colesterol (53mg/dL, 115mg/dL, 200mg/dL, 271mg/dL, 323mg/dL, 587mg/dL).

Para la determinación de la precisión se utilizarón rangos bajos, intermedios y altos del pool de suero, que caén dentro del rango lineal establecido al principio

Glucosa (50mg/dL, 120mg/dL, 300mg/dL).

Urea (10mg, 100mg/dL, 200mg/dL).

Ac Urico (1.5mg/dL, 5.0mg/dL, 12.0mg/dL).

Creatinina (1.0mg/dL, 2.0mg/dL, 12.0mg/dL).

Colesterol (53mg/dL, 200mg/dL, 587mg/dL)

La exactitud, se realizó con las mismas concentraciones utilizadas durante la determinación de la linealidad aplicando el mismo criterio.

Glucosa (50mg/dL, 100mg/dL, 120mg/dL, 250mg/dL, 300mg/dL, 440mg/dL).

Urea (10mg/dL, 30mg/dl, 50mg/dL, 100mg/dL, 200mg/dL, 330mg/dL).

Ac Urico (1.5mg/dL, 2mg/dL, 5mg/dL, 7mg/dL, 12mg/dL, 14mg/dL)

Creatinina (0.5mg/dL, 1mg/dL, 1.5mg/dL, 2mg/dL, 4mg/dL, 12mg/dL, 24mg/dL).

Colesterol (53mg/dL, 115mg/dL, 200mg/dL, 271mg/dL, 323mg/dL, 587mg/dL).

Estabilidad. Se realizó con dos temperaturas, ambiente y a 8° C durante 24hrs, 48hrs y 72hrs, utilizando la primera lectura a temperatura y tiempo cero como testigo. Se utilizó las siguiente concentraciones considerando que la degradación obtenida sea mas facil de visualizar:

Glucosa (300mg/dL).

Urea (200mg/dL).

Ac Urico (9.0mg/dL).

Creatinina (2.0mg/dL).

Colesterol (200mg/dL).

Repetibilidad y Reproducibilidad. Se utilizó las siguientes concentraciones por ser las que con mayor frecuencia se repiten en pacientes sanos que acuden a realizarse estos estudios de rutina:

Glucosa (100mg/dL).

Urea (30mg/dL).

Ac. Urico (5.0mg).

Creatinina. (1.0mg/dL).

Colesterol (200mg/dL).

FASE IV. El análisis de las muestras se realizó por triplicado y diario para la determinación de la linealidad del método. La exactitud se realizo con las mismas concentraciones utilizadas para la linealidad.

Para la precisión del método de medición (intra-ensayo) se seleccionaron de manera independiente seis concentraciones, equivalentes al 100% de lo indicado en el método analítico.

Para la precisión del método (día a día) se necesitó de dos analistas que realizaron dos determinaciones independientes para una muestra homogénea del analito a un valor cercano al 100%.

La determinación de la estabilidad, se llevó a cabo al analizar por triplicado una muestra homogénea (previamente sometida a pruebas). Las muestras se sometieron a diferentes temperaturas (temperatura ambiente y refrigeración durante 72 hrs).

Para obtener el límite de detección se realizaron tres diluciones, por duplicado de manera independiente de una solución del analito de interés, procurando obtener respuestas bajas del sistema de medición.

Fase V. Análisis de resultados.

Los resultados obtenidos se sometieron a una prueba de Regresión lineal y ANADEVIA para verificar la linealidad, posteriormente se realizó el cálculo de porcentaje de recuperación para evaluar la exactitud.

La precisión para una misma corrida se calculó utilizando la desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV).

Para obtener la precisión día a día se realizó una ANADEVIA de dos factores y se determinó la desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV).

La estabilidad se obtuvo por medio de una "t de Dunnet" con c comparaciones y 2 (c+1) grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.795.

Para obtener el valor del límite de detección se calculó la pendiente (m) de la relación de 6 diluciones, y se dividió entre tres veces la desviación estándar de los blancos.

Linealidad del Método

Se determinó a partir de un pool de pacientes cada una de manera independiente haciendo los análisis por triplicado.

Las concentraciones de las muestras deben ser las adecuadas para que utilizando el método propuesto, las concentraciones de cada pool deben estar dentro del intervalo de la linealidad del sistema incluyendo, aquellas que abarquen los rangos de decisión médica y también incluyendo aquellos rangos que marca el fabricante tanto superior e inferior.

1) Tabular los resultados con base al siguiente formato:

Concentración del pool				Concentración del pool Valores Observados			
Valores esperados (100mg/mL)				por Triplicado (100mg/mL)			
X11, X12 ,			X1n	Y11, Y12,			Y1n
X21, X22 ,			X2n	Y21, Y22,			Y2n
Xn1, Xn2,			X12n	Yn1, Yn2,			Y12n

Se procede a hacer los siguientes cálculos.

2) Cálculos preliminares:

$$\Sigma x = X11 + X12 + \dots + X1n + X21 + X22 + \dots + X2n$$

$$\Sigma y = Y11 + Y12 + \dots + Y1n + Y21 + Y22 + \dots + Y2n$$

$$\Sigma x^2 = X^2_{11} + X^2_{12} + \dots + X^2_{1n} + X^2_{21} + X^2_{22} + \dots + X^2_{2n}$$

$$\Sigma y^2 = Y^2_{11} + Y^2_{12} + \dots + Y^2_{1n} + Y^2_{21} + Y^2_{22} + \dots + Y^2_{2n}$$

$$\Sigma xy = X11*Y11 + X12*Y12 + \dots + X1n*Y1n + X21*Y21 + X22*Y22 + \dots + X2n*Y2n$$

3) Cálculos Finales:

$$m = \frac{n (\Sigma xy) - (\Sigma x) (\Sigma y)}{n (\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2}$$

donde:

m=pendiente

b=ordenada al origen

$$b = \frac{y - m (\Sigma x)}{n}$$

$$r^2 = \frac{[n (\sum xy) - (\sum x) (\sum y)]^2}{[n (\sum x^2) (\sum y^2) - (\sum x)^2 (\sum y)^2]}$$

B. Por ciento Recuperado.

Calcular el por ciento recuperado (R) para cada cantidad recuperada, con la siguiente ecuación:

$$R = (y/x)100$$

1) Tabular los siguientes resultados:

$$R_1, R_2, R_3, \dots, R_N$$

2) Cálculos preliminares:

$$\sum R = R_1 + R_2 + R_3 + \dots + R_N$$

$$\sum R^2 = R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + \dots + R_N^2$$

$$R = (\sum R)^2$$

$$DE = \left[\frac{N (\sum R) - (\sum R)^2}{N (N - 1)} \right]^{1/2}$$

$\sum R$ = Sumatoria de lo recuperado

DE = Desviación estandar.

3) Cálculos Finales:

Coficiente de variación:

$$CV = (DE / R) 100$$

Exactitud y Repetibilidad al 100%

1. Tabular los resultados del porcentaje recuperado (R), con base al siguiente formato:

$$R_1, R_2, R_3, \dots, R_N$$

2. Cálculos preliminares:

$$\Sigma R = R_1, R_2, R_3, \dots, R_N$$

$$\Sigma R^2 = R_1^2, R_2^2, R_3^2, \dots, R_N^2$$

$$R = \frac{(\Sigma R)}{N}$$

$$DE = \left[\frac{N (\Sigma R) - (\Sigma R)^2}{N (N - 1)} \right]^{1/2}$$

3) Cálculos Finales:

Coficiente de variación:

$$CV = (DE / R) 100$$

Precisión (Reproducibilidad)

El siguiente procedimiento únicamente es aplicable cuando se utilicen 2 días, 2 analistas y 3 determinaciones.

Cuando se utilicen un número distinto de días y/o analistas y/o recobros por analista y día, se sugiere que se consulte a un estadístico.

1. Tabular los resultados con base en el siguiente formato:

		Analista	
		1	2
Día	1	y111 y112 y113	y211 y212 y213
	2	y121 y122 y123	y221 y222 y223

2. Cálculos preliminares:

$$y... = y_{111} + y_{112} + y_{113} + y_{121} + y_{122} + y_{123} + y_{211} + y_{212} + y_{213} + y_{221} + y_{222} + y_{223}$$

$$\Sigma y^2... = y^2_{111} + y^2_{112} + y^2_{113} + y^2_{121} + y^2_{122} + y^2_{123} + y^2_{211} + y^2_{212} + y^2_{213} + y^2_{221} + y^2_{222} + y^2_{223}$$

$$\bar{y} = y... / N$$

$$DE = \left[\frac{N (\Sigma R) - (\Sigma R)^2}{N (N - 1)^2} \right]^{1/2}$$

N = número total de determinaciones
(en este caso específico N=12)

3. Cálculos Finales:

Coefficiente de variación

$$CV = (DE / \bar{y}) 100$$

Estabilidad de la muestra Analítica.

1. Tabular los resultados con base al siguiente formato y calcular los resultados indicados:

Inicial	Condición/Tiempo		
	1	2	m
Y1	Y4	Y7	Y _{n-2}
Y2	Y5	Y8	Y _{n-1}
Y2	Y6	Y9	Y _n

2.- Cálculos Preliminares para el intervalo de confianza:

Media	\bar{Y}_0	\bar{Y}_1	\bar{Y}_2	\bar{Y}_M
Varianza	S_0^2	S_1^2	S_2^2	S_M^2

Varianza Ponderada:

$$Sp_1^2 = \frac{2S_0^2 + 2S_1^2}{2(C + 1)}$$

$$Sp_2^2 = \frac{2S_0^2 + 2S_2^2}{2(C + 1)}$$

$$Sp_2^2 = \frac{2S_0^2 + 2S_m^2}{2(C + 1)}$$

3. Cálculos finales para el intervalo de confianza:

Para cada condición X tiempo

$$IC = (\bar{Y}_1 - \bar{Y}_0) \pm t^* \times \sqrt{Sp_1^2 \left[\frac{2}{3} \right]}$$

Donde:

t^* = valor de la t de Dunnett con C comparaciones y $2 (c+1)$ grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975.

4. Cálculos preliminares para el coeficiente de variación:

Para cada condición/tiempo/muestra calcular el factor (I) con la siguiente fórmula:

$$I = \frac{\text{(análisis de la muestra/condición/tiempo) } i}{\text{(análisis inicial)}} \times 100$$

$$I_1 = \frac{Y_4}{Y_1} \times 100$$

$$I_2 = \frac{Y_5}{Y_2} \times 100$$

$$I_3 = \frac{Y_6}{Y_3} \times 100$$

$$I_4 = \frac{Y_7}{Y_1} \times 100$$

$$I_5 = \frac{Y_8}{Y_2} \times 100$$

$$I_6 = \frac{Y_9}{Y_3} \times 100$$

$$I_7 = \frac{Y_{n-2}}{Y_1} \times 100$$

$$I_8 = \frac{Y_{n-1}}{Y_2} \times 100$$

$$I_9 = \frac{Y_n}{Y_3} \times 100$$

Para cada condición/tiempo calcular la media del factor (I) con la siguiente fórmula:

$$\bar{I} = \frac{\text{SI (Condición/tiempo)}}{N}$$

donde:

N = número de muestras para cada condición/tiempo

$$I_1 = \frac{I_1 + I_2 + I_3}{3}$$

$$I_2 = \frac{I_4 + I_5 + I_6}{3}$$

$$I_3 = \frac{I_7 + I_8 + I_9}{3}$$

La media del factor (I) para cada condición/tiempo deberá cumplir con los siguientes criterios:

Método	Valor de I
Cromatográficos	98-102%
Titrimétricos	98-102%
Químicos y Espectrofotométricos	97-103%
Microbiológicos	95-105%

Determinación de Límite de Detección:

Un analista debe preparar por lo menos tres diluciones, por duplicado, de manera independiente; a partir de una misma solución patrón de la sustancia de interés, procurando obtener respuestas bajas del sistema de medición; y por lo menos cinco blancos. Medir su propiedad bajo las mismas condiciones de medición.

1) Tabular los resultados con base al siguiente formato:

Concentración (X)	Propiedad Medida (Y)
_____	_____
_____	_____
_____	_____
Blancos	
1	_____
2	_____
3	_____
4	_____
5	_____

2) Calcular la suma de la concentración (Σx), la suma de cuadrados de la concentración (Σx^2), la suma de propiedad medida (Σy), la suma de cuadrados de la propiedad medida (Σy^2), la suma del producto de la concentración por la propiedad medida ($\Sigma x y$), determinar el número de concentraciones (t), el número de replicaciones por concentración (r), el número de pares ordenados ($n = r t$), la suma de la propiedad medida de los blancos ($\Sigma y'$), la suma de cuadrados de la propiedad medida de los blancos ($\Sigma y'^2$), y el número de los blancos ($n' = 5$).

$$(\Sigma x) = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$(\Sigma y) = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$(\Sigma x^2) = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$(\Sigma y^2) = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$(\Sigma xy) = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$(t) = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$(r) = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$n = (rt) = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$(\Sigma y') = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$(\Sigma y') = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$(n') = 5$$

3) Calcular el valor de la pendiente (m)de la relación concentración propiedad medida.

$$m = \frac{nt(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)}{nt(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2}$$

4) Calcular la desviación estandar de los blanco (sb), con la siguiente ecuación.

$$Sb = \frac{5 \Sigma y'^2 - (\Sigma y')^2}{n'(n' - 1)}$$

5) Calcular el limite de detección (LD), con la siguiente ecuación:

$$LD = \frac{3 Sb}{m}$$

Resultados

Los resultados obtenidos se presentan en tablas y gráficas.

Tabla 1. Estadística descriptiva de la propiedad medida para los resultados de la linealidad para la glucosa, urea, ácido úrico, creatinina y colesterol.

Determinación	Coefficiente de Regresión	Coefficiente de Determinación	Ordenada al Origen	Pendiente	Error de Estimación
GLUCOSA	0.99999	0.9998	-0.3229	1.0002	1.2648
UREA	0.9999	0.99998	0.3831	1.0006	1.3244
AC URICO	0.9995	0.9999	-0.0088	1.0051	0.0538
CREATININA	0.9999	0.9998	-0.0211	1.0135	0.1149
COLESTEROL	0.9999	0.9999	0.7842	1.0049	1.8244

En la tabla se presentan los resultados de la linealidad de los métodos analíticos observándose que las ordenadas al origen para glucosa, urea y colesterol están muy lejanos del 0.

Tabla 2. Estadística descriptiva de la propiedad medida para los resultados de la precisión para la glucosa, urea, ácido úrico, creatinina y colesterol.

Determinación	Media	Desviación Estandar	Coefficiente de Variación (%)
GLUCOSA	50.16	1.06	2.12
	121.33	1.24	1.02
	299.33	0.94	0.31
UREA	9.83	0.37	3.78
	101	1.01	0.99
	201.01	1.01	0.49
ÁCIDO ÚRICO	1.5	0.01	1.06
	5.04	0.05	1.1
	12.02	0.03	0.3
CREATININA	1	0.03	3.11
	2	0.01	0.79
	12	0.02	0.24
COLESTEROL	52.33	1.24	2.38
	200.5	2.36	1.17
	587.33	3.63	0.61

En la tabla se presentan los resultados de la precisión donde se observa que las variaciones mas grandes se obtienen a concentraciones bajas de todos los analitos.

Tabla 3. Estadística descriptiva de la propiedad medida para los resultados del % recuperación (exactitud) para la glucosa, urea, ácido úrico, creatinina y colesterol.

Determinación	Media	Desviación Estandar	Coficiente Variación %	Límite Superior (LSIC)	Límite Inferior (LIIC)
GLUCOSA	98.88	1.24	1.24	100.45	99.3
UREA	100.71	2.87	2.85	1001.28	100.14
ÁCIDO ÚRICO	100.3	1.02	1.02	100.73	99.3
CREATININA	100.3	1.02	1.02	100.73	99.3
COLESTEROL	99.86	1.21	1.22	100.42	99.29

En la tabla se presentan los resultados de la exactitud donde se observa que la glucosa esta ligeramente por debajo del limite inferior, así como el colesterol esta ligeramente por arriba del rango inferior, los demas estan casi en la media de ambos rango.

Tabla 4. Estadística descriptiva de la propiedad medida para los resultados de la precisión intradía-intraanalista para la reproducibilidad del método para la glucosa, urea, ácido úrico, creatinina y colesterol.

Determinación	Desviación Estandar	Coefficiente de Variación (%)
GLUCOSA	1.72	1.7
UREA	1.16	3.82
ÁCIDO ÚRICO	0.001	0.02
CREATININA	0.03	2.94
COLESTEROL	1.65	1.7

En la tabla se presentan los resultados de la precisión intradía-intraanalista ensayo donde observamos que la la urea y creatinina presentan los coeficientes mas altos.

Tabla 5. Resultados de la estabilidad de las muestras, realizada en refrigeración, 8 °C durante 24, 48 y 72 hrs para la glucosa, urea, ácido úrico, creatinina y colesterol.

Determinación	Media Aritmetica	t de dunnet Calculada	Intervalo de Confianza al 95 %
CERO	303.66	*****	*****
GLUCOSA	299	1.01	(-0.33 A 1.63)
	304	2.37	(-2.04 A 2.70)
	304	2.72	(2.05 A 3.39)
CERO	199.83	*****	*****
UREA	200.66	2.06	(-0.73 A 3.39)
	199.66	2.54	(-2.21 A 2.87)
	199.66	2.38	(-2.21 A 2.71)
CERO	8.93	*****	*****
ACIDO URICO	8.97	0.52	(-0.48 A 0.56)
	8.96	0.57	(-0.54 A 0.60)
	8.95	0.57	(-0.55 A 0.59)
CERO	2.03	*****	*****
CREATININA	2.04	0.19	(-0.18 A 0.20)
	2.04	0.19	(-0.18 A 0.20)
	2.04	0.23	(-0.22 A 0.24)
CERO	200.66	*****	*****
COLESTEROL	201.33	2.11	(-1.44 A 2.78)
	201	2.32	(-1.98 A 2.66)
	201	2.27	(-1.97 A 2.61)

En la tabla se presentan los resultados de la estabilidad a 8 °C donde observamos que todos los valores obtenidos están dentro del intervalo de confianza del 95%

Tabla 6. Resultados de la estabilidad de las muestras, realizada a temperatura ambiente, durante 24, 48 y 72 hrs para la glucosa, urea, ácido úrico, creatinina y colesterol.

Determinación	Media Aritmetica	t de dunnet Calculada	Intervalo de Confianza al 95%
CERO	303.66	*****	*****
GLUCOSA	303.66	1.76	(-1.43 A 2.09)
	295	2.19	(-10.52 A -6.13)
	244	1.93	(-61.26 A -57.39)
CERO	199.83	*****	*****
UREA	200.01	2.21	(-1.54 A 2.88)
	205.33	2.43	(3.56 A 8.43)
	226.01	2.43	(26.67 A 29.10)
CERO	8.93	*****	*****
ACIDO URICO	9.04	0.52	(-0.41 A 0.63)
	9.07	0.57	(-0.43 A 0.71)
	9.56	0.61	(0.01 A 0.34)
CERO	2.03	*****	*****
CREATININA	2.05	0.23	(-0.21 A 0.25)
	2.06	0.23	(-0.20 A 0.26)
	2.14	0.23	(-0.12 A 0.34)
CERO	200.66	*****	*****
COLESTEROL	203	1.92	(0.41 A 4.26)
	200.66	2.54	(-2.54 A 2.54)
	202.33	2.43	(-0.43 A 4.43)

En la tabla se presentan los resultados de la estabilidad a donde observamos que la glucosa y la urea no están dentro del intervalos de confianza del 95%.

TABLA 7. Resultado de los límites de detección del método para la determinación de glucosa, urea, ácido úrico, creatinina y colesterol.

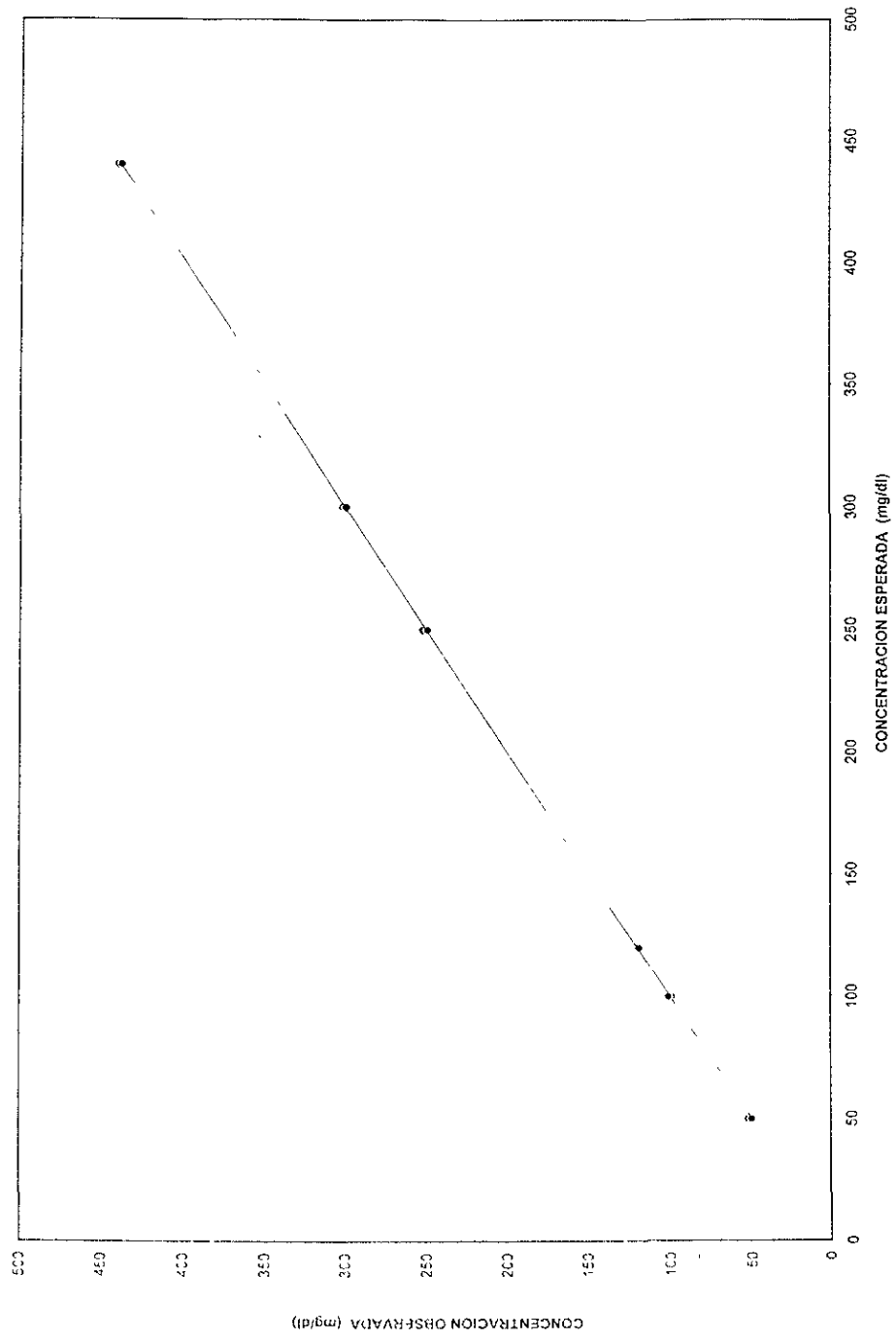
Determinación	Ordenada al origen	Pendiente	Medía de Blancos	Desviación Estandar	Límite de Detección
GLUCOSA	0.000127	1	0	0	0
UREA	-0.1661	1.0022	0.8	0.3	0.598
ÁCIDO ÚRICO	0.003498	0.9998	-0.01	0.007071	0.02
CREATININA	0.004976	0.9989	-0.13	0.0137	0.05
COLESTEROL	0.008338	0.9999	0.2	0.7483	2.24

En la tabla se presentan los resultados del límite de detección donde observamos que el límite mas alto lo observamos en el colesterol y los mas bajos con el ácido urico y la creatinina.

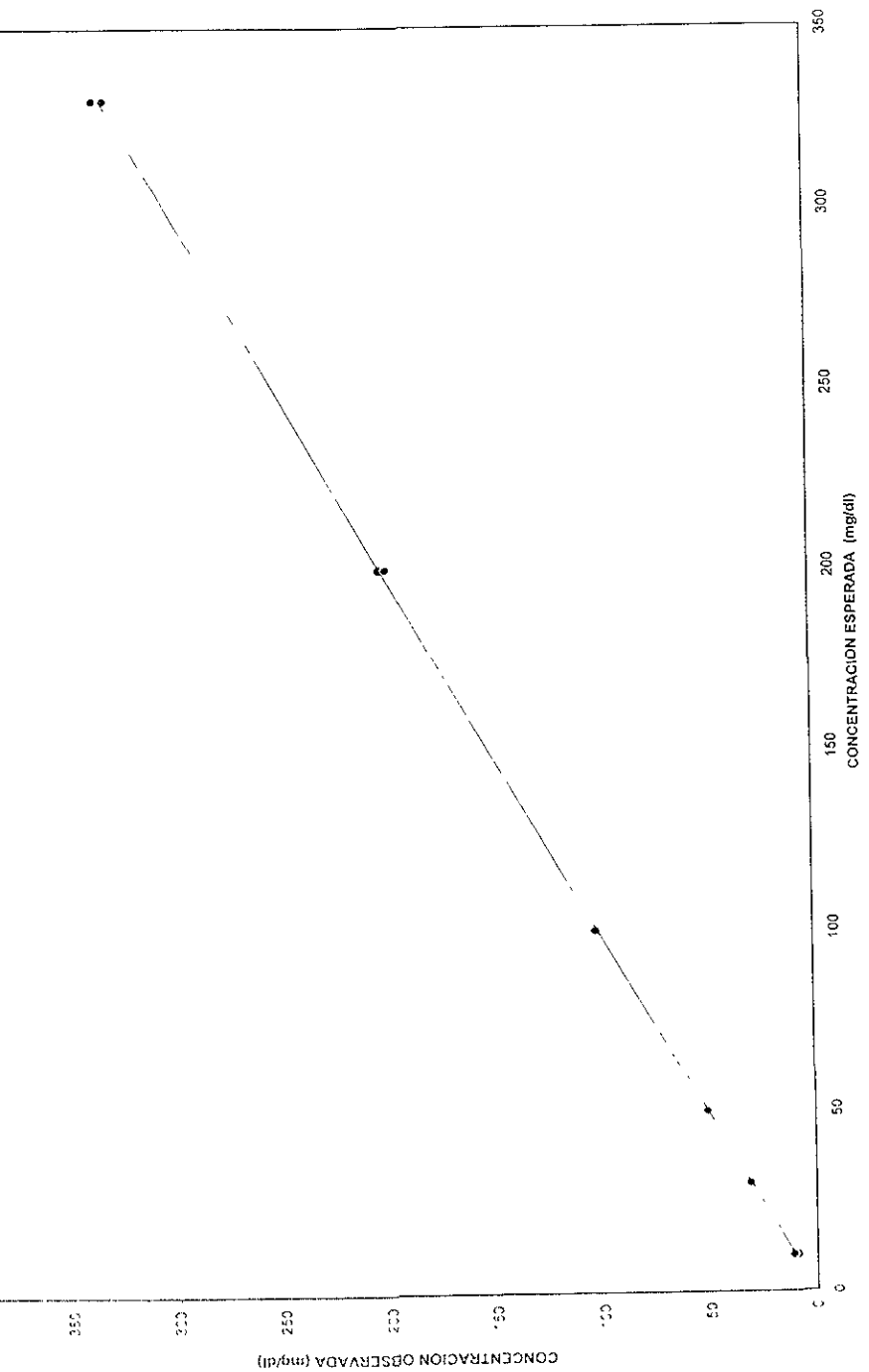
Tabla 8. Estadística descriptiva de la propiedad medida para la comparación de métodos en los equipos hitachi 717 y abbott vp para glucosa, urea, ácido úrico, creatinina y colesterol.

Determinación	Coefficiente de Regresión.	Coefficiente de Determinación	Ordenada al Origen	Pendiente	Error de Estimación
GLUCOSA	0.9992	0.9999	0.179	1.0087	2.873
UREA	0.999	0.9999	-0.4581	1.0623	0.251
AC URICO	0.9856	0.9715	-0.2442	1.0239	0.4555
CREATININA	0.9956	0.9999	0.1874	0.8873	0.2214
COLESTEROL	0.9954	0.9954	6.9135	1.0147	21.0251

En la tabla se presentan los resultados de la comparación de métodos en los que observamos que presentan buena correlación todos los analitos pero se observa que el colesterol presenta un error de estimación mas alto con respecto a los demás.

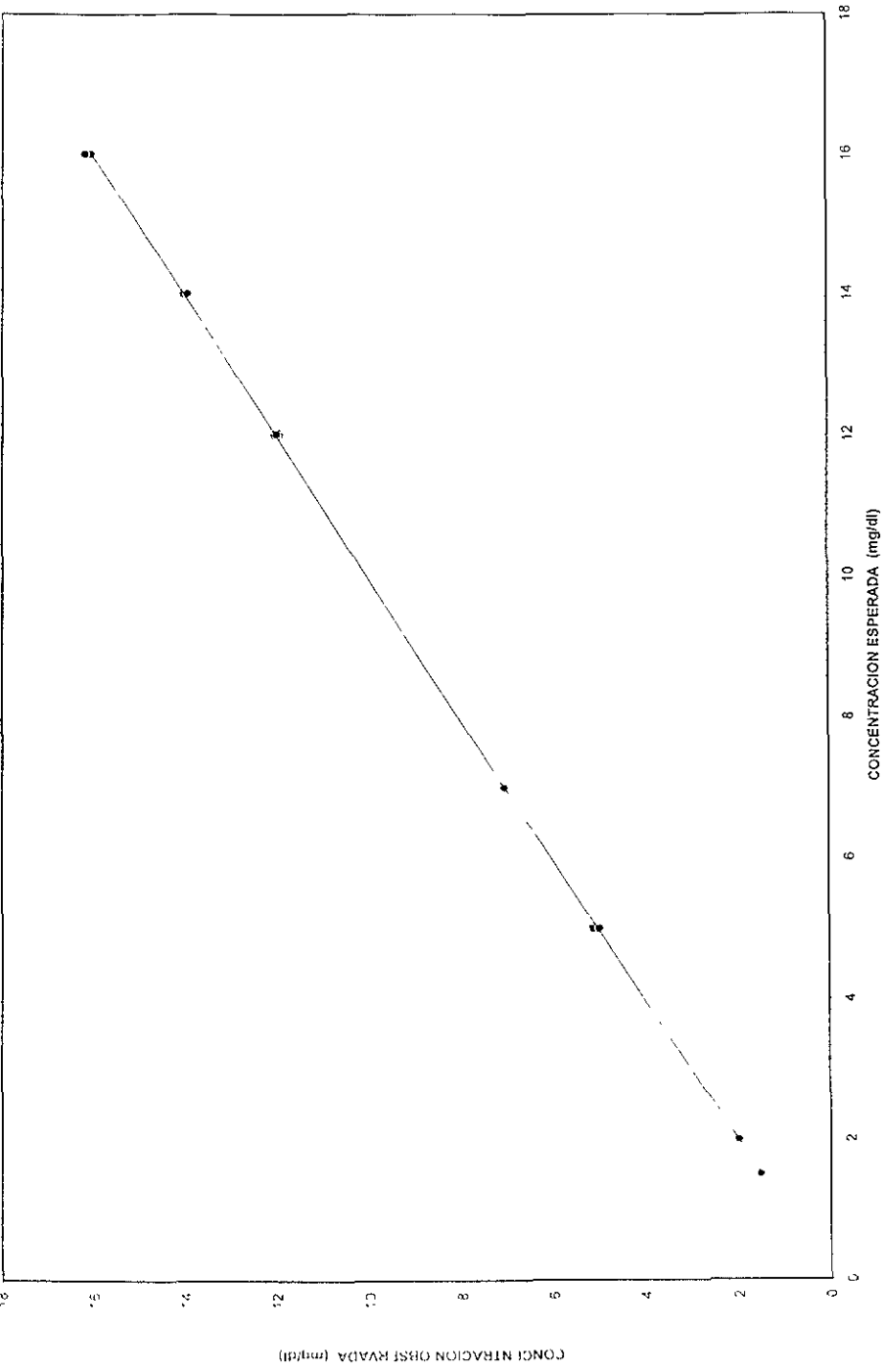


GRAFICA 1 LINEALIDAD DEL METODO PARA LA DETERMINACION DE GLUCOSA

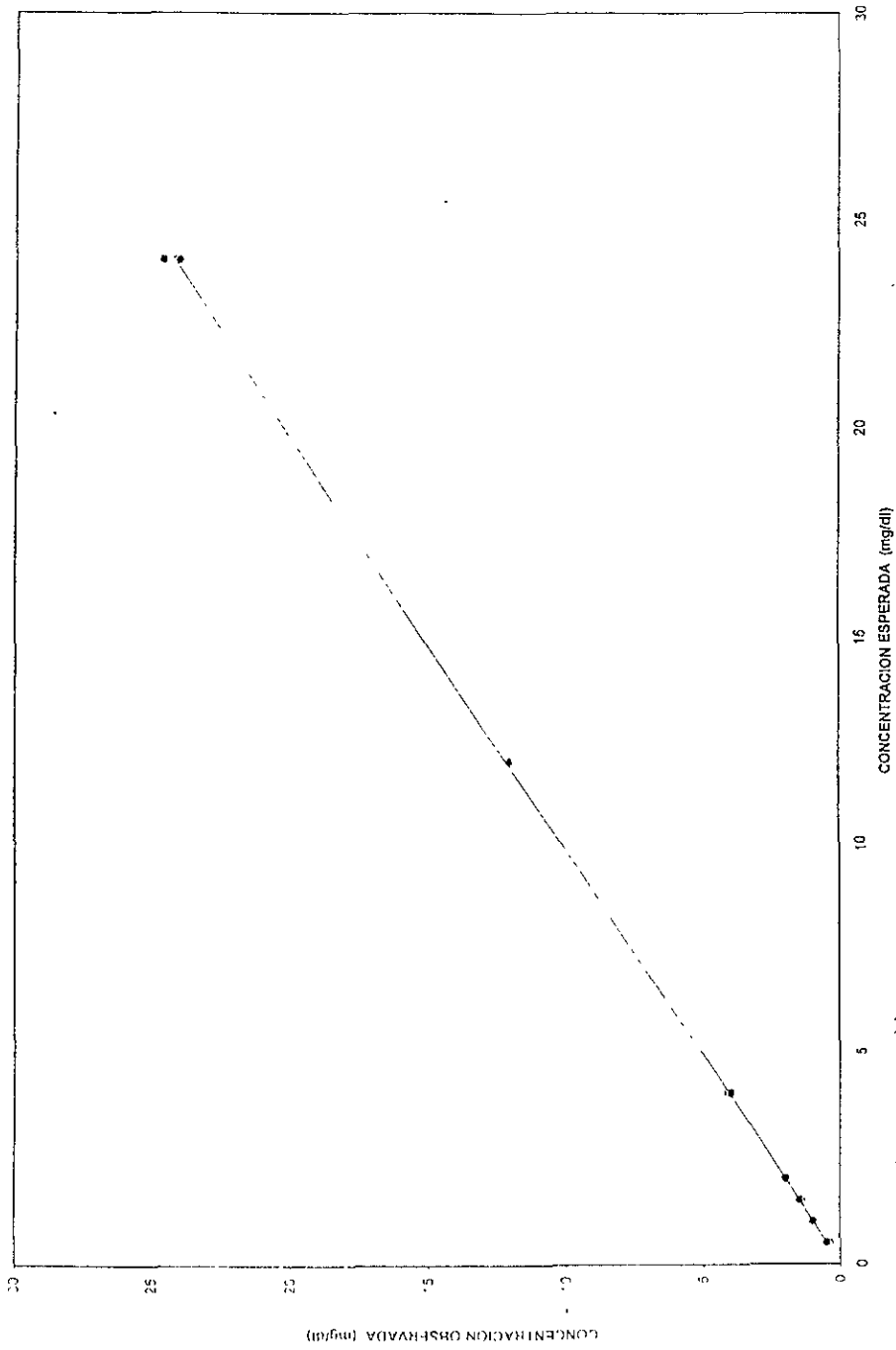


LINEALIDAD DEL METODO PARA LA DETERMINACION DE UREA

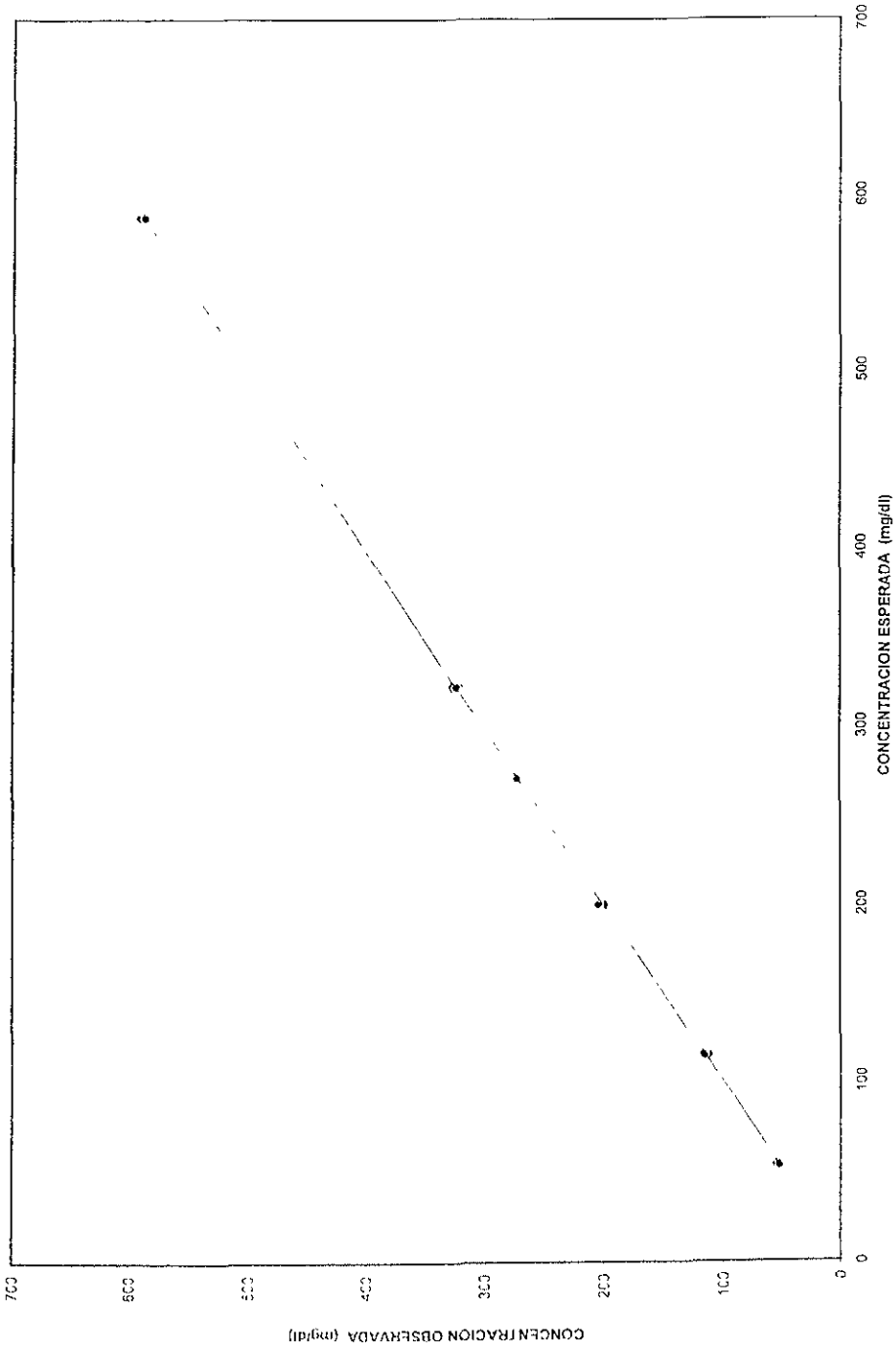
GRAFICA 2



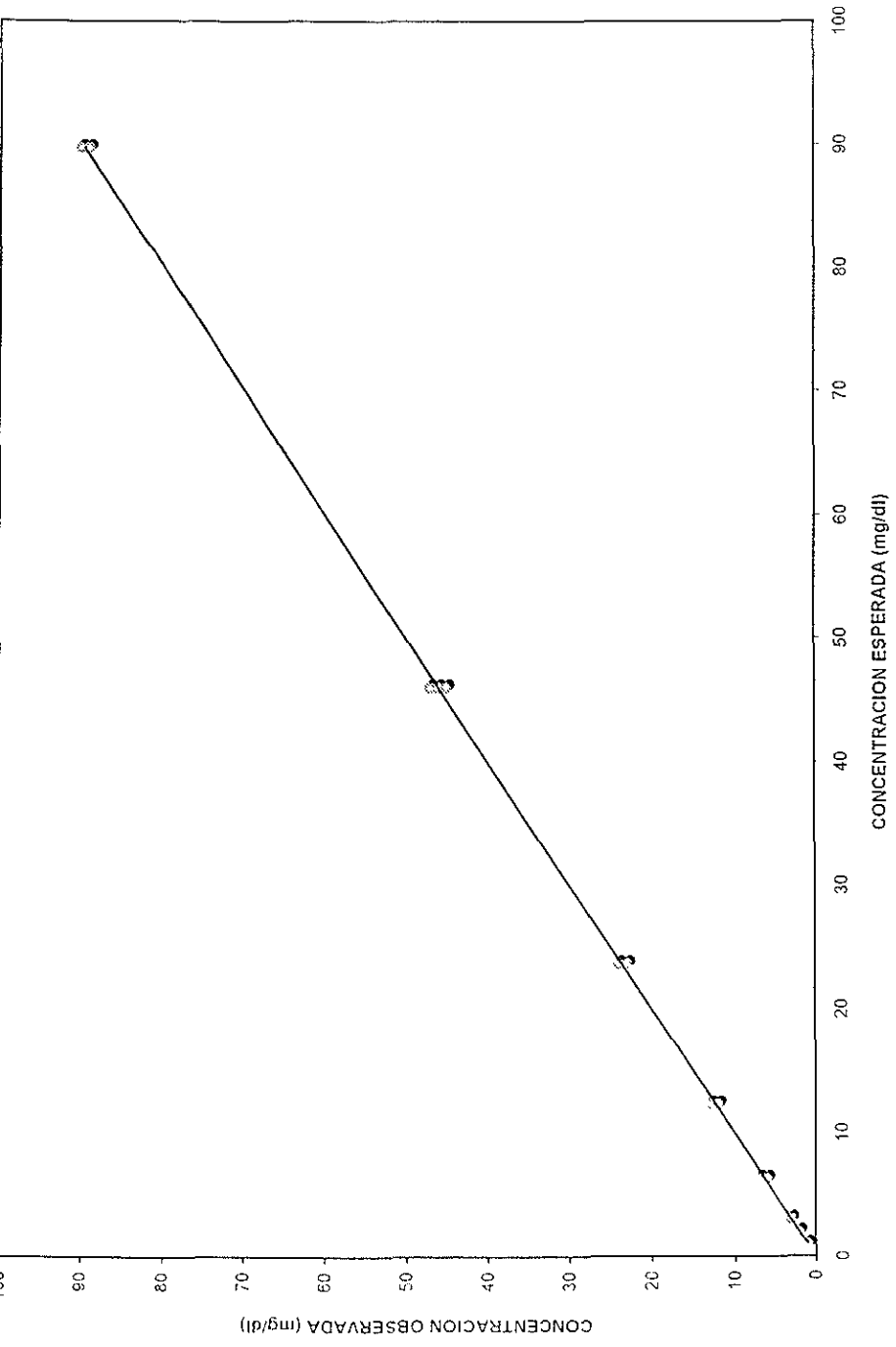
GRAFICA 3 LINEALIDAD DEL METODO PARA LA DETERMINACION DE ACIDO URICO



GRAFICA 4 LINEALIDAD DEL METODO PARA LA DETERMINACION DE CREATININA

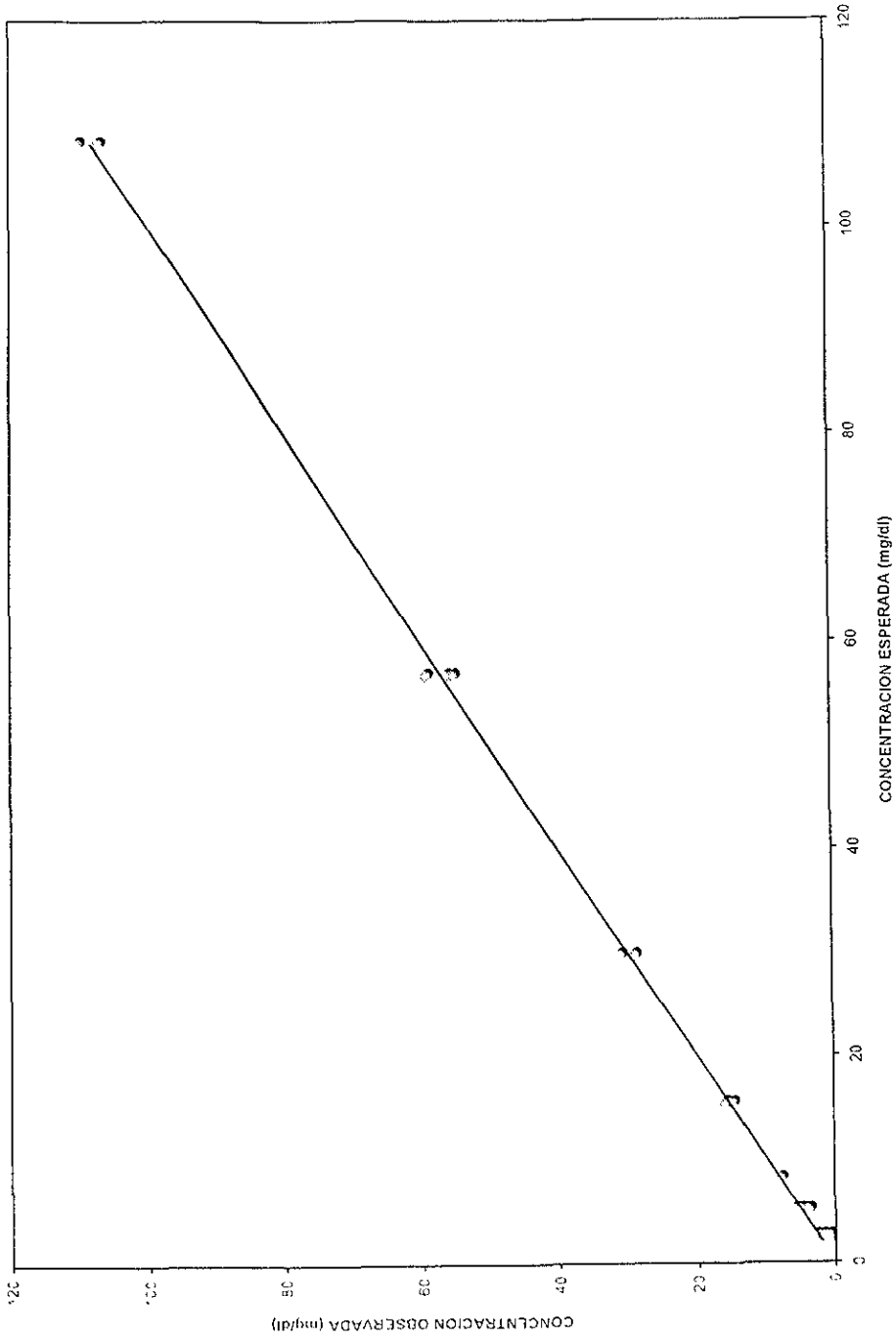


GRAFICA 5 LINEALIDAD DEL METODO PARA LA DETERMINACION DE COLESTEROL



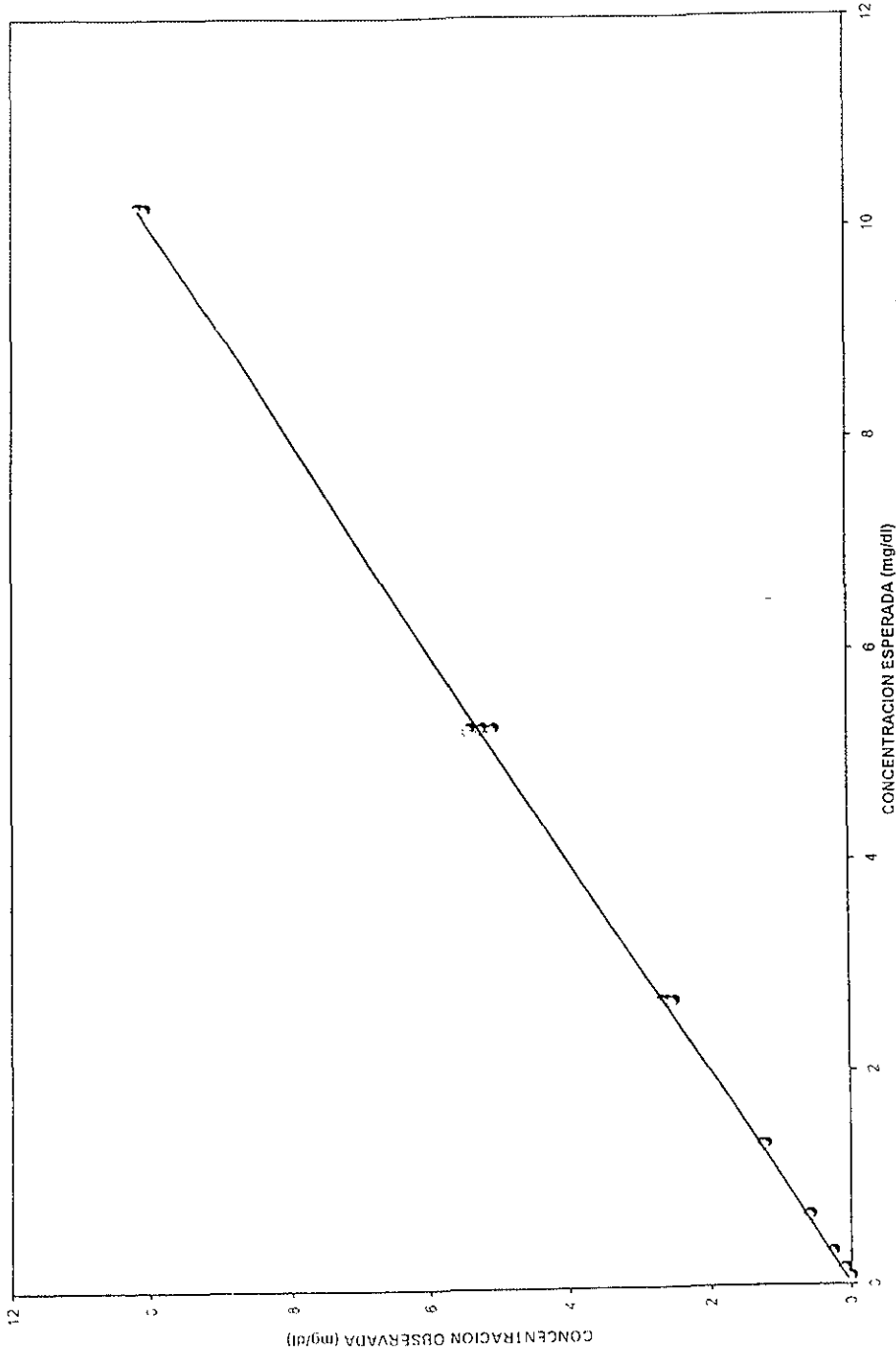
LIMITE DE DETECCION PARA LA DETERMINACION DE LA GLUCOSA

GRAFICA 6

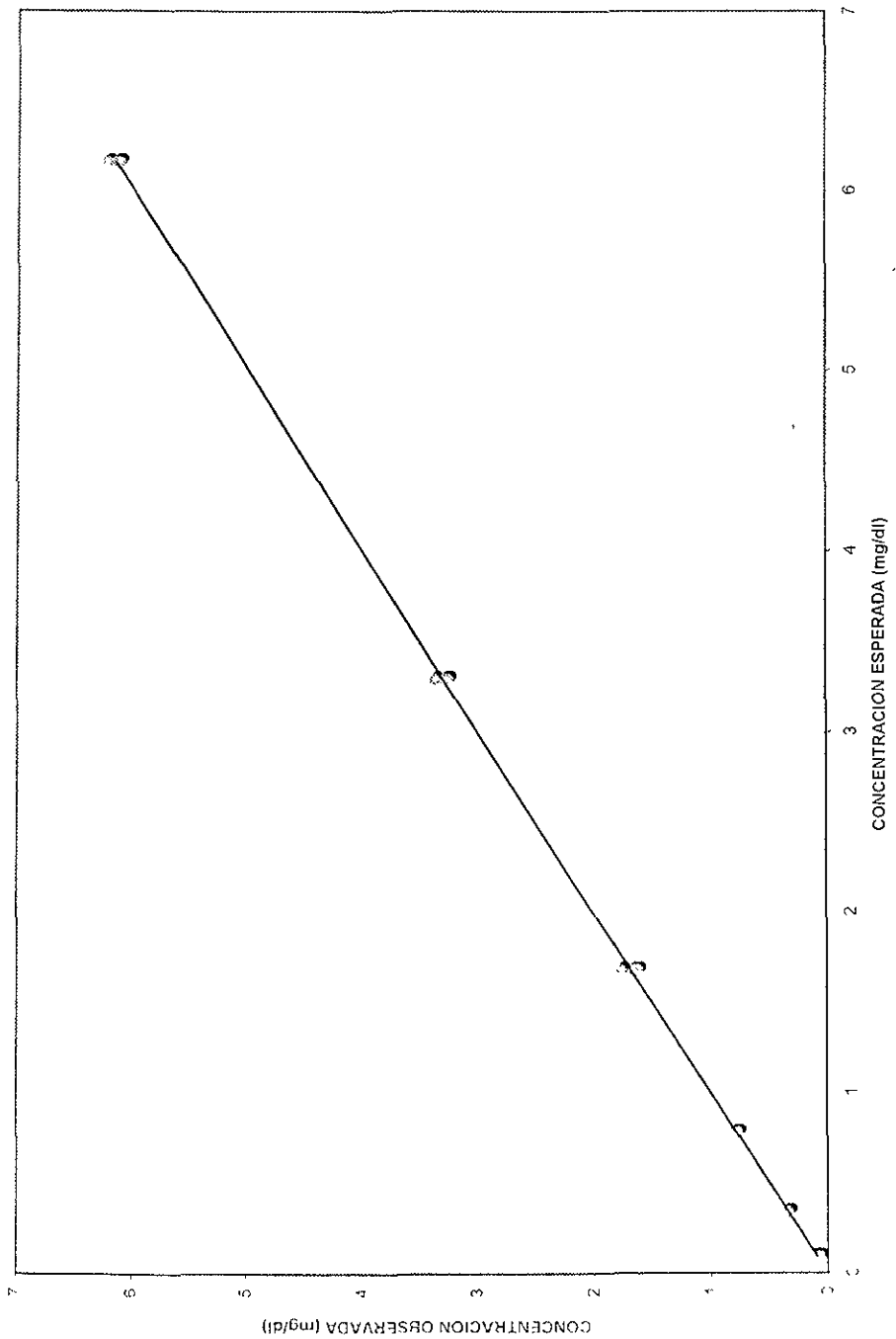


GRAFICA 7

LIMITE DE DETECCION PARA LA DETERMINACION DE UREA

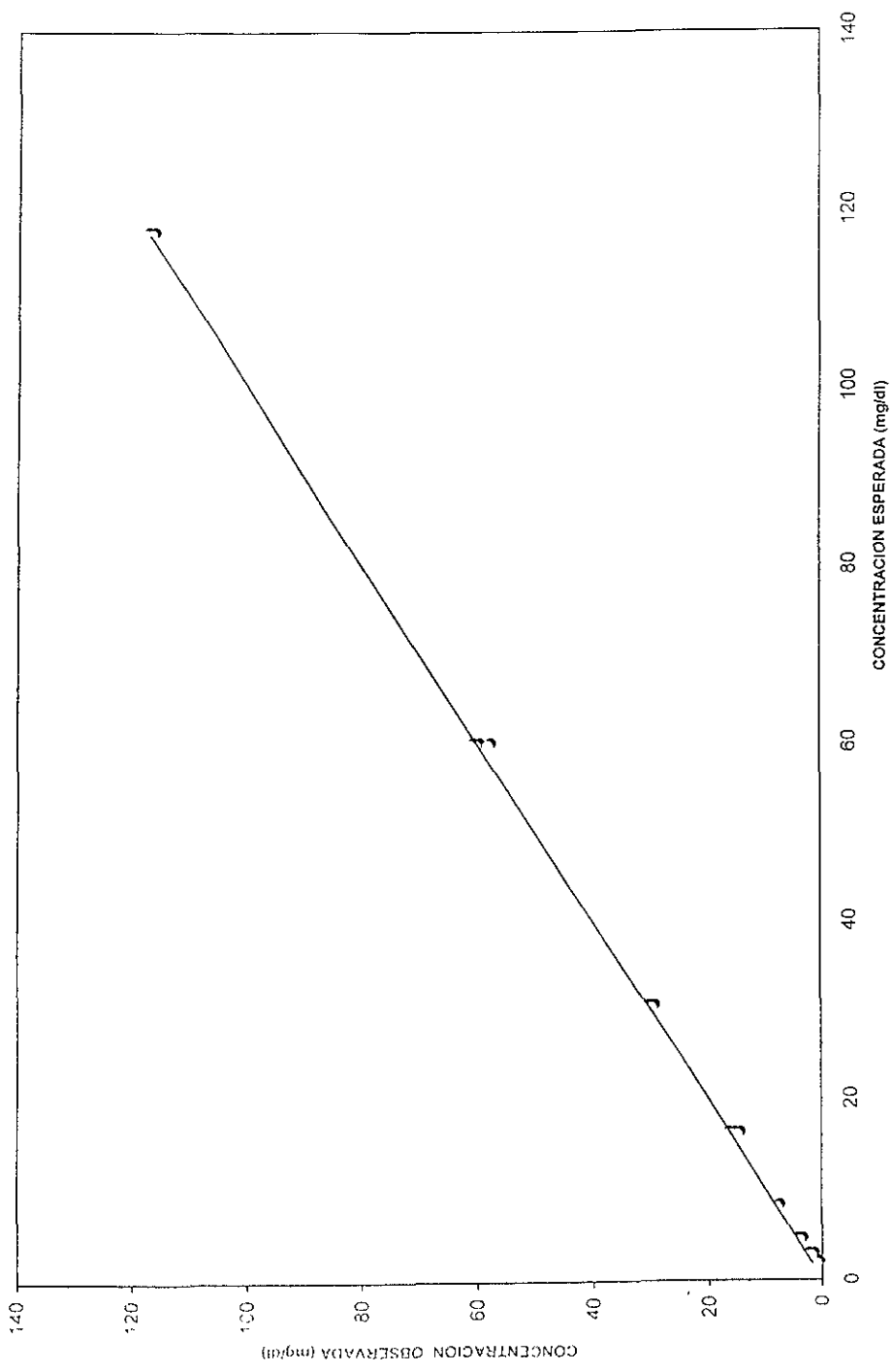


GRAFICA 8 LIMITE DE DETECCION PARA LA DETERMINACION DE ACIDO URICO

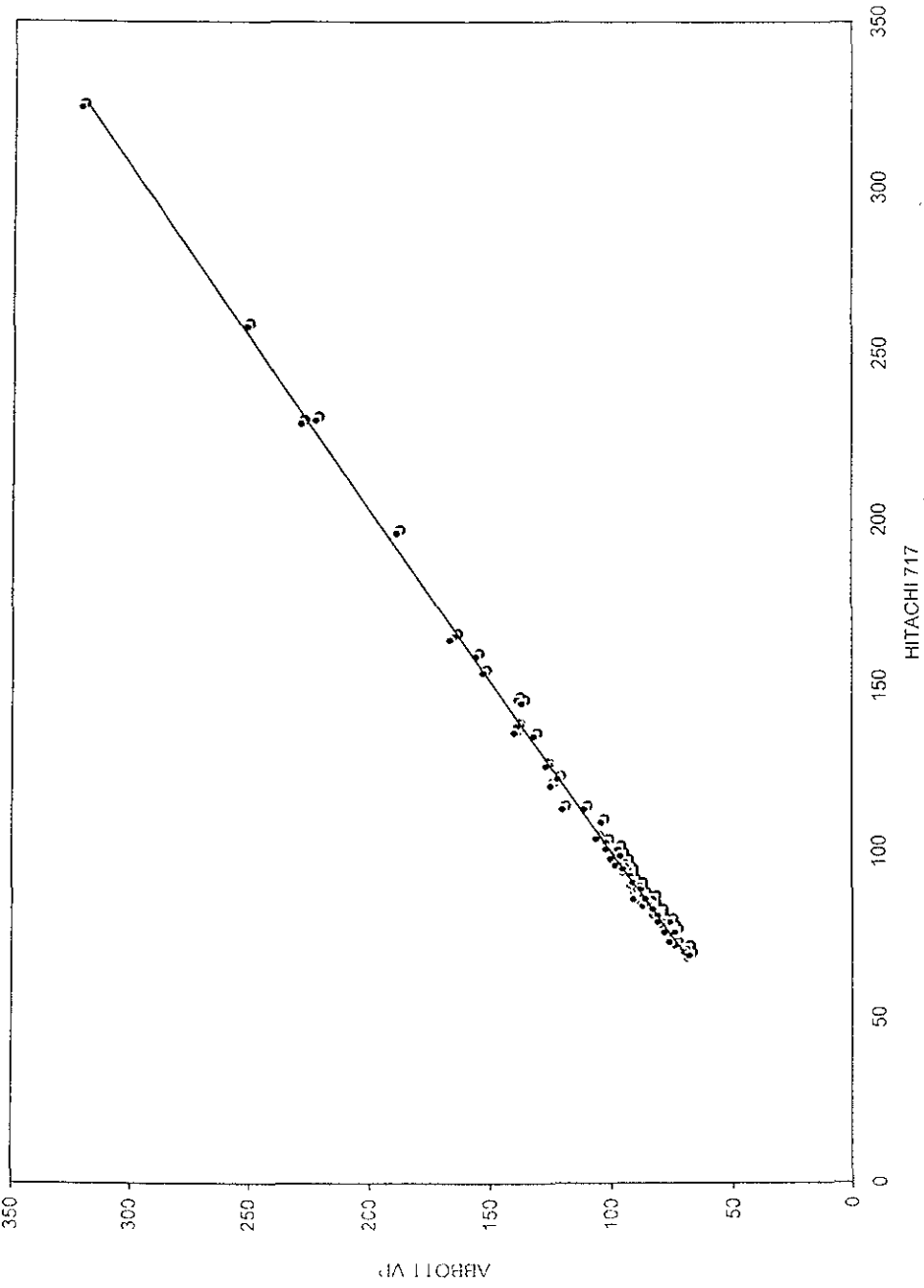


LIMITE DE DETECCION PARA LA DETERMINACION DE CREATININA ²

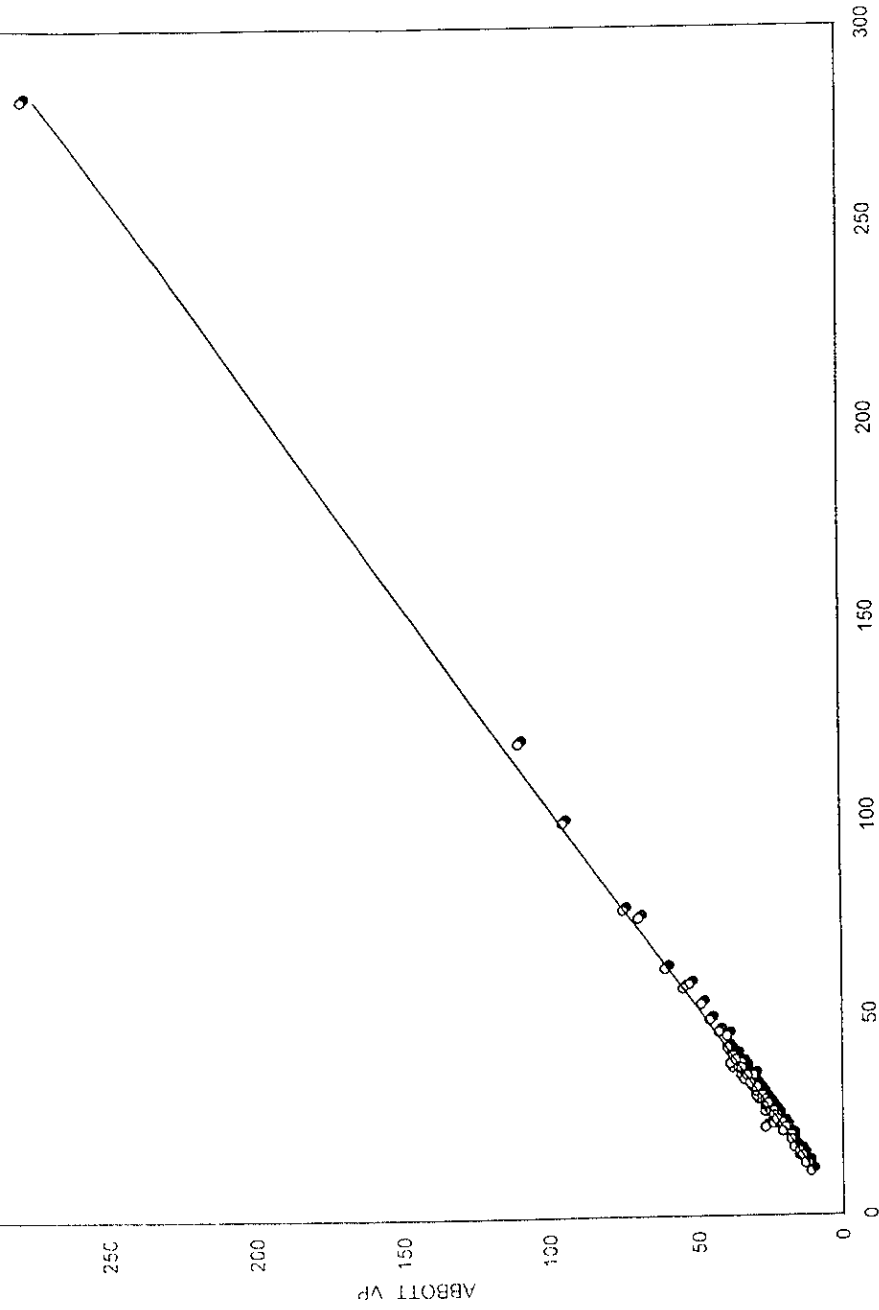
GRAFICA 9



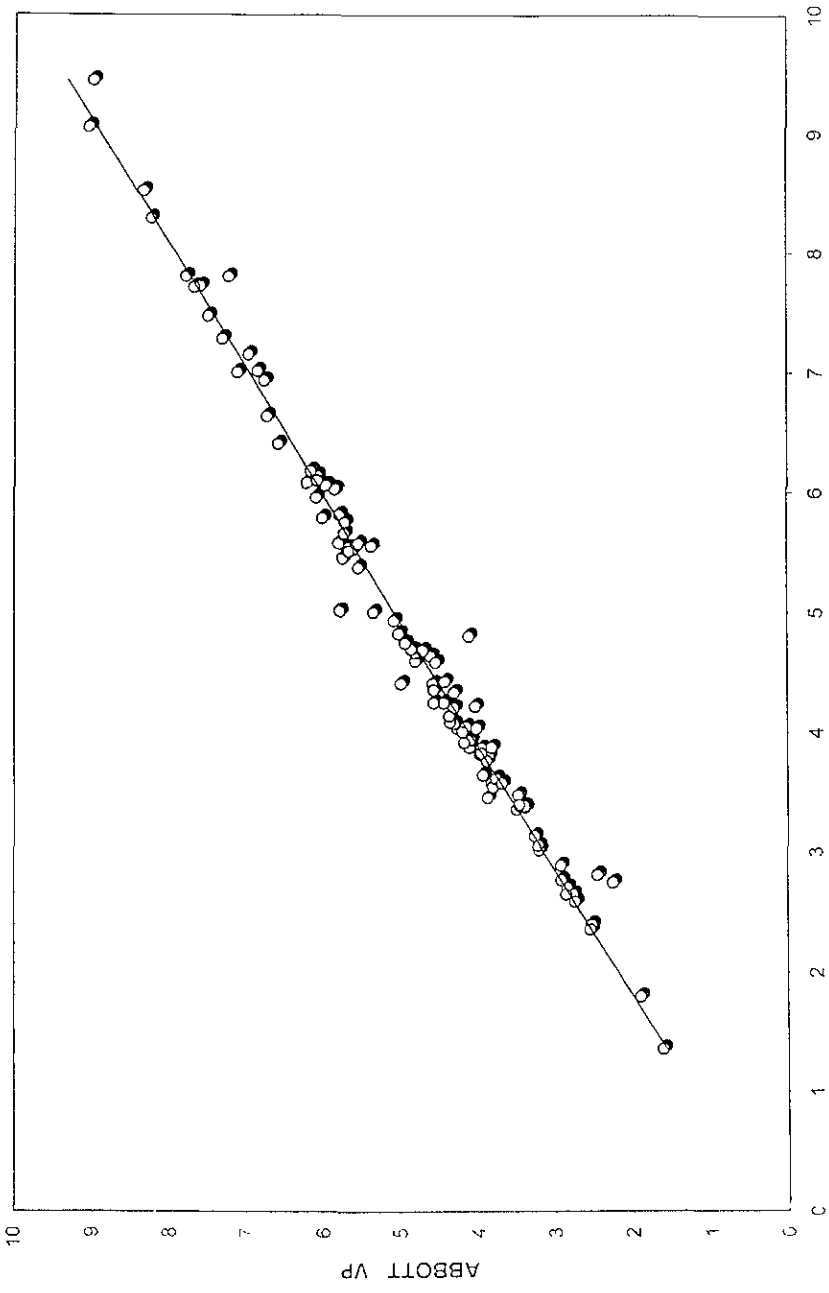
GRAFICA 10 LIMITE DE DETECCION PARA LA DETERMINACION DE COLESTEROL



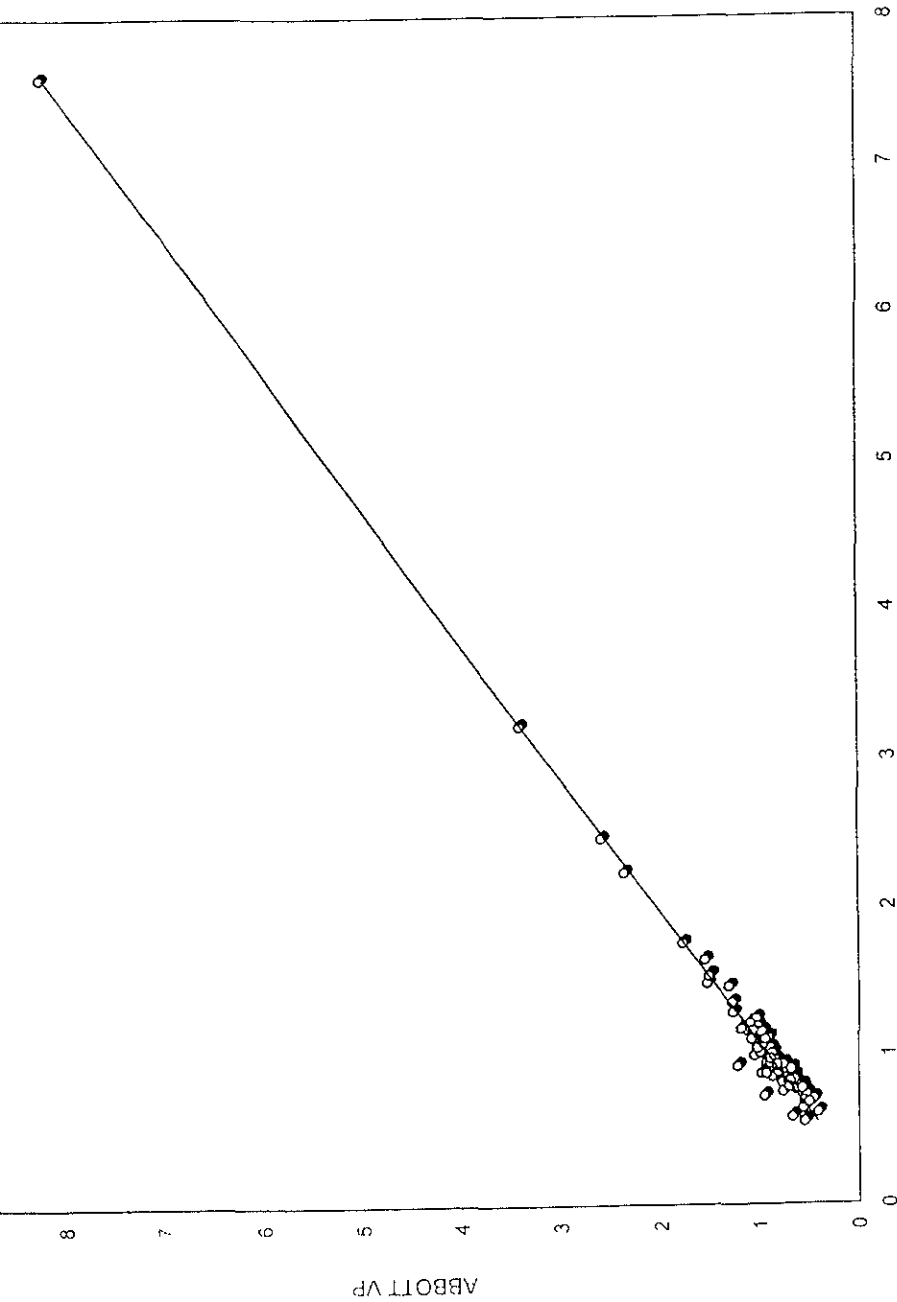
GRAFICA 11 CORRELACION ENTRE EL EQUIPO ABBOTT VP VS HITACHI 717 PARA LA DETERMINACION DE GLUCOSA
96



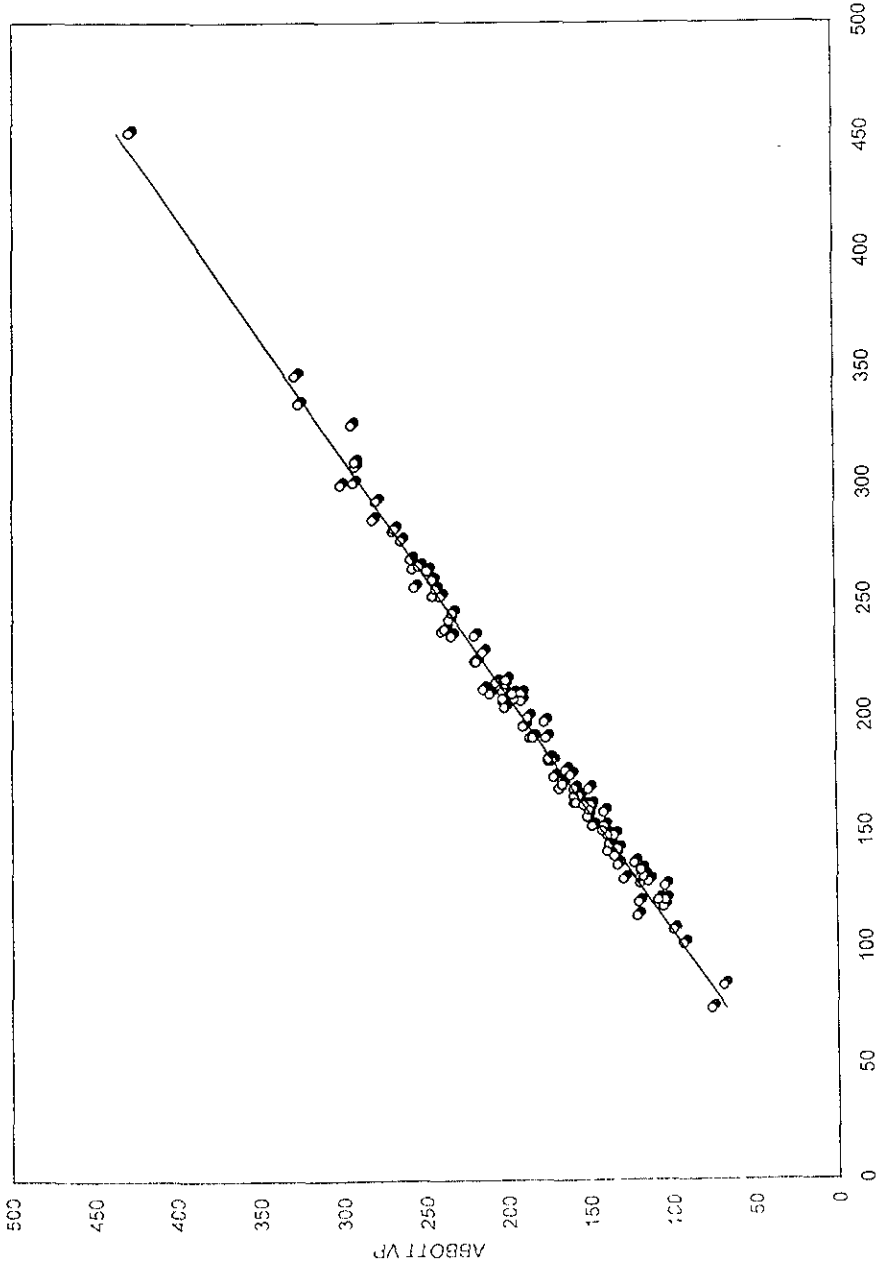
GRAFICA 12 CORRELACION ENTRE EL EQUIPO ABOOTT VP VS HITACHI 717 PARA LA DETERMINACION DE UREA



GRAFICA 13 CORRELACION ENTRE EL EQUIPO ABBOTT VS HITACHI 717 PARA DETERMINACION DE ACIDO URICO



HITACHI 717
CORRELACION ENTRE EL EQUIPO ABOOTT VP VS HITACHI 717 PARA LA DETERMINACION DE CREATININA
GRAFICA 14



GRÁFICA 15
CORRELACION ENTRE EL EQUIPO ABBOTT VP VS HITACHI 717 PARA DETERMINACION DE COLESTEROL
100

Resumen de los resultados obtenidos para los 5 analitos validados.

Parámetros	Glucosa	Urea	Analitos Creatinina	Ac Urico	Colesterol
Linealidad	R= 0.9999	R= 0.9999	R= 0.9995	R= 0.9999	R= 0.9999
Precisión	C.V= 2.12 %	C.V= 3.78 %	C.V= 1.06 %	C.V= 3.11 %	C.V= 2.38 %
	C.V= 1.02 %	C.V= 0.99 %	C.V= 1.1 %	C.V= 0.79 %	C.V= 1.17 %
	C.V= 0.34 %	C.V= 0.49 %	C.V= 0.3 %	C.V= 0.24 %	C.V= 0.61 %
Exactitud	LSIC= 100.45	LSIC= 101.28	LSIC= 100.73	LSIC= 100.73	LSIC= 100.42
	LSIC= 99.3	LSIC= 100.14	LSIC= 99.3	LSIC= 99.3	LSIC= 99.29
Reproducibilidad	C.V= 1.7 %	C.V= 3.82 %	C.V= 0.02 %	C.V= 2.94 %	C.V= 1.7 %
Estabilidad 8 °C	24 hr t dunnet=1.01 t	dunnet=2.06 t	dunnet=0.52 t	dunnet=0.19 t	dunnet=2.11
	48 hr t dunnet=2.37 t	dunnet=2.54 t	dunnet=0.57 t	dunnet=0.19 t	dunnet=2.32
	72 hr t dunnet=2.72 t	dunnet=2.38 t	dunnet=0.57 t	dunnet=0.23 t	dunnet=2.27
Estabilidad temperatura ambiente	24 h t dunnet=1.76 t	dunnet=2.21 t	dunnet=0.52 t	dunnet=0.23 t	dunnet=1.92
	48 hr t dunnet=2.19 t	dunnet=2.43 t	dunnet=0.57 t	dunnet=0.23 t	dunnet=2.54
	72 hr t dunnet=1.93 t	dunnet=2.43 t	dunnet=0.61 t	dunnet=0.23 t	dunnet=2.43
Límite de detección	0	0.598	0.02	0.05	2.24
<i>Comparación</i>					
Hitachi vs Abbott	Sx/y=2.873	Sx/y=0.025	Sx/y=0.455	Sx/y=0.221	Sx/y=21.025

En la tabla se muestra los resultados obtenidos en la validación de los 5 analitos propuestos.

Análisis de resultados.

En la validación de los métodos, glucosa GOD-PAP, (Glucosidasa), urea, (Ureasa UV), ácido úrico, (Uricasa), creatinina, (Jaffé con blanco de Twin), y colesterol (CHO-PAP) se llevaron a cabo una serie de pasos que nos permitieron alcanzar condiciones próximas al nivel óptimo y en consecuencia mejorar su exactitud, precisión y linealidad de cada determinación.

El resultado de la linealidad del método para la determinación de la glucosa (gráfica 1), muestra una relación altamente significativa entre los valores observados y los valores esperados, (Tabla 1). Con una $r=0.9999$ y una $r^2=0.9998$ y bajo estas condiciones de trabajo el fenómeno es lineal, con una recta calculada de $Y= 0.3229 + 1.0002X$. Con estas condiciones de operación el método analítico con la recta calculada se obtienen resultados con un 99.98% de precisión.

El resultado de la linealidad del método para la urea (gráfica 2), muestra una relación altamente significativa entre los valores observados y los valores esperados, (Tabla 1). Con una $r=0.9999$ y una $r^2=0.9999$ y bajo estas condiciones de trabajo el fenómeno es lineal, con una recta calculada de $Y= 0.3831 + 1.0006X$. Con estas condiciones de operación el método analítico con la recta calculada produce resultados con un 99.99% de precisión.

El resultado de la linealidad del método para la ácido úrico (gráfica 3), muestra una relación altamente significativa entre los valores observados y los valores esperados (Tabla 1). Con una $r=0.9995$ y una $r^2=0.9999$ y bajo estas condiciones de trabajo el fenómeno es lineal, con una recta calculada de $Y= - 0.0088 + 1.0051X$. Con estas condiciones de operación el método analítico con la recta calculada produce resultados con un 99.99% de precisión.

El resultado de la linealidad del método para la creatinina (gráfica 4) muestra una relación altamente significativa entre los valores observados y los valores esperados. (Tabla 1).

Con una $r=0.9999$ y una $r^2=0.9998$ y bajo estas condiciones de trabajo el fenómeno es lineal, con una recta calculada de $Y= -0.0211 + 1.013X$.

Con estas condiciones de operación el método analítico con la recta calculada produce resultados con un 99.98% de precisión.

El resultado de la linealidad del método para la colesterol (gráfica 5), muestra una relación altamente significativa entre los valores observados y los valores esperados, (Tabla 1). Con una $r=0.9999$ y una $r^2=0.9999$ y bajo estas condiciones de trabajo el fenómeno es lineal, con una recta calculada de $Y= 0.7842 + 1.0049X$.

Con estas condiciones de operación el método analítico con la recta calculada produce resultados con un 99.99% de precisión.

En la determinación de la precisión del método para la determinación de la Glucosa en general se observa una buena precisión (Tabla 2), aunque para concentraciones altas se nota una mejor precisión de acuerdo a los requisitos establecidos por el fabricante (Boheringer-Mannheim) por lo que son aceptables.

En la determinación de la precisión del método para Urea se observa una buena precisión (Tabla 2) , sin embargo para concentraciones altas la precisión está un poco por arriba del coeficiente de variación establecido ($3 <$), los valores están muy cercanos a la concentración establecida, esto se debe probablemente a que la desviación estándar es muy pequeña pero se observa buena precisión en las siguientes concentraciones y comparando los resultados con los del fabricante se observa el mismo comportamiento; a concentraciones bajas el coeficiente es alto con respecto a las otras dos concentraciones pero éstas se encuentran dentro del criterio establecido por el fabricante (Boeringer-Mannheim) siendo aceptables.

En la determinación de la precisión del método para el Ácido Úrico se observa una buena precisión a concentraciones altas (Tabla 2), para concentraciones bajas denota una mejor precisión de acuerdo a los requisitos establecidos por el fabricante (Boehringer-Mannheim), los cuales son aceptables

En la determinación de la precisión del método para la Creatinina se observa una buena precisión a concentraciones altas, (Tabla 2), sin embargo para concentraciones bajas el coeficiente obtenido esta ligeramente por arriba del establecido por por organismos internacionales del 3 % y comparando los resultados con los del fabricante (Boehringer-Mannheim) se observa que los coeficientes que obtienen en la casa comercial para concentraciones bajas, son más altos a los obtenidos en el presente trabajo posiblemente debido alas condiciones de trabajo.

En la determinación de la precisión del método para el Colesterol se observa un buen resultado a concentraciones bajas (Tabla 2), para concentraciones altas denota una mejor precisión de acuerdo a los requisitos establecidos por organizaciones Internacionales +/- 3% y a los obtenidos por el fabricante (Boehringer-Mannheim) los cuales son similares a los obtenidos en el presente trabajo del 3% para metodos espectrofotometricos.

En cuanto a la exactitud al 100%, los cinco métodos (Glucosa, Urea, Ácido Úrico, Creatinina, y Colesterol) presentaron tanto un límite superior de intervalo de confianza mayor al 100%, y límite inferior de intervalo de confianza menor al 100% (Tabla 3). Se observa que los valores de recuperación están dentro del rango de recuperación (95-105%).

La reproducibilidad del método se determinó realizando un análisis de varianza con dos criterios de clasificación entre analista y día, (Tablas 4), muestran los recobros obtenidos por los dos analistas en dos diferentes días. Observándose que en los métodos para la determinación de Glucosa, Urea, Acido Úrico, Creatinina y Colesterol no se ve afectada la reproducibilidad por el día, ni por el analista, ya que la Fcal es menor que la de tablas para el día y el analista, lo que hace reproducibles los métodos.

La estabilidad de la muestra se evaluó a diferentes condiciones; temperatura ambiente y refrigeración durante 24, 48 y 72 hrs.

La evaluación se realizó comparándose con un control, que es el valor de la "t" de Dunnett, donde se puede observar que las muestras son estables a 8° C durante 24, 48 y 72 hrs para todos los analitos. A temperatura ambiente se observa que la glucosa a 24 hrs es estable sin embargo a 48 se ve una pequeña degradación y 72 hrs la degradación es mucho mayor, siendo esta última estadísticamente significativa (Tabla 5 y 6). Lo mismo que ocurre con la urea, estos resultados posiblemente se debieron a una contaminación bacteriana. Con el ácido úrico no se observan cambio excepto que a temperatura ambiente a 72 hrs, hay una ligera variación (Tabla 6). En la creatinina no se observa ningún cambio (Tabla 5 y 6) y el colesterol a temperatura ambiente 24 hrs existe un ligero cambio (Tabla 6) lo cual posiblemente se deba a una pequeña contaminación, sin embargo a 48 y 72 hrs ésta es estable ya que están almacenadas de forma independientemente.

El criterio de Dunnett nos dice que dentro del intervalo de confianza debe estar incluido el cero; de no estarlo nos dice que existe un cambio significativo dentro de las muestras.

En el límite de detección se observa que para la glucosa el valor que se obtuvo fue cero (Tabla 7), que es más bajo al obtenido en la casa comercial (2 mg/dL), para la urea el valor fue 0.598 (Tabla 7), que es más bajo al obtenido en la casa comercial (2 mg/dL), pero se puede deducir que el valor obtenido fue de 2 porque el último valor no es un valor coherente.

Para el ácido úrico el valor obtenido fue 0.02 (Tabla 7), el cual es más bajo al obtenido en la casa comercial (0.2 mg/dL), para la creatinina el valor fue 0.05 (Tabla 7), el cual es más bajo al obtenido en la casa comercial (0.1 mg/dL), para el colesterol el límite que se obtiene fue de 2.24 (Tabla 7), que es un poco más alto al obtenido en la casa comercial (2 mg/dL).

En la comparación del método para glucosa con equipo Hitachi vs Abbott (Tabla 8) se realizó un análisis de regresión donde se obtuvo una ($r=0.9992$) y una ($r^2=0.9999$), bajo estas condiciones de trabajo el fenómeno se considera lineal, con una recta calculada $Y=0.17908+1.0087X$ (Gráfica 11).

En condiciones de operación el equipo Hitachi con respecto a Abbott produce resultados con un 99.99% de precisión.

En la comparación del método para urea con equipo Hitachi vs Abbot (Tabla 8) se realizó un análisis de varianza donde se obtuvo una ($r=0.9990$) y una ($r^2=0.9999$), bajo estas condiciones de trabajo el fenómeno se considera lineal, con una recta calculada $Y= -0.4581+1.0623X$ (Gráfica 12). En condiciones de operación el equipo Hitachi con respecto a Abbott produce resultados con un 99.99% de precisión.

En la comparación del método para ácido úrico con equipo Hitachi vs Abbot (Tabla 8) se realizó un análisis de varianza donde se obtuvo una ($r=0.9856$) y una ($r^2=0.9715$), bajo estas condiciones de trabajo el fenómeno se considera lineal, con una recta calculada $Y= -0.2442+1.0239X$ (Gráfica 13). En condiciones de operación el equipo Hitachi con respecto a Abbott produce resultados con un 97.15% de precisión, siendo menos reproducible que para los otros analitos, pero bastante aceptable.

En la comparación del método para creatinina con equipo Hitachi vs Abbot (Tabla 8) se realizó un análisis de varianza donde se obtuvo una ($r=0.9956$) y una ($r^2=0.9999$), bajo estas condiciones de trabajo el fenómeno se considera lineal, con una recta calculada $Y= 0.1874+0.8873X$ (Gráfica 14). En condiciones de operación el equipo Hitachi con respecto a Abbott produce resultados con un 99.99% de precisión

En la comparación del método para colesterol con equipo Hitachi vs Abbot (Tabla 8) se realizó un análisis de varianza donde se obtuvo una ($r=0.9954$) y una ($r^2=0.9908$), bajo estas condiciones de trabajo el fenómeno se considera lineal, con una recta calculada $Y= 6.935+1.0142X$ (Gráfica 15). En condiciones de operación el equipo Hitachi con respecto a Abbott produce resultados con un 99.08% de precisión.

Discusión de resultados.

Se realizó la determinación de los analitos, glucosa, urea, ácido úrico, creatinina y colesterol en el equipo hitachi 717, sin problema alguno se determinó, la precisión para cada analito en 3 niveles de concentración observandose que estos analitos presentan muy buena precisión a concentraciones altas como la glucosa, urea, ácido úrico, creatinina y colesterol y bajas como el ácido úrico con coeficientes de 0.2-3% que cumplen con el requisito establecido para un método espectrofotométrico que es del 3%. Por lo cual se concluye que el método es repetible utilizando la misma muestra.

La exactitud se obtuvo utilizando el recobro de las concentraciones de la linealidad mediante la siguiente fórmula (% de recuperación=Valor recuperado/Valor esperado X100) los valores obtenidos en general se recuperaron sobre un 100-101% lo que nos indica que están dentro del límite aceptable porque los límites de recuperación aceptables se definen como de 95-100% (a distancia de 5%) por lo tanto se concluye que el método es exacto por lo tanto valores obtenidos para estos analitos se acercan a los valores reales.

La linealidad obtenida para los cinco analitos se considera aceptable puesto que la pendiente obtenida es casi de 1 y la ordenada al origen es casi de cero a excepción de la glucosa colesterol y urea donde la ordenada al origen es mayor de 1 que mediante las pruebas de hipótesis realizadas para la ordenada al origen y pendiente se aceptaron por que los valores obtenidos eran menores a los de t de tablas con una distribución t con 16 (glucosa, urea y colesterol) y 19 (ácido úrico, creatinina) grados de libertad que divide el área en 95% central y 5% del combinado superior e inferior es de 2.12 y 2.09 y dibujando una línea recta a través de los puntos obtenidos concluyendo que el método es lineal de acuerdo a la definición de linealidad donde la pendiente es igual a 1 y la ordenada es igual a 0

El límite de detección obtenido es un valor bajo alrededor de 0.5 a 2 mg/dL muy por debajo de los niveles clínicamente aceptables que nos habla de una buena sensibilidad por lo que se concluye que lo que indica el fabricante es verdadero pudiéndose utilizar con confianza estos reactivos.

Conclusiones.

Se llevó a cabo la validación del Hitachi 717 para los analitos: glucosa, urea, creatinina, ácido úrico, y colesterol, encontrándose.

La precisión para cada analito tanto en concentraciones bajas como altas está entre 0.2 y 3 %.

La exactitud en el porcentaje de recobro está entre 100-101 % para todos los analitos.

La linealidad es aceptable teniéndose valores de $r^2=0.999$ en todos analitos, aunque la ordenada al origen es lejana de 0 para glucosa, urea y colesterol.

El límite de detección se encontró de 0.5 a 2 mg/dL, muy por debajo de los niveles clínicamente aceptables.

La reproducibilidad y repetibilidad mostró un C.V < 3% para todos los analitos.

La muestra son estables a 8 °C durante 3 días para todos los analitos. A temperatura ambiente se observa una degradación de glucosa y urea a las 24 hr y de ácido úrico a las 48 hr, creatinina y colesterol son estables los 3 días.

Se observó una muy buena correlación entre el Hitachi 717 y el VP Analyzer para los cinco analitos validados.

Con lo anteriormente expuesto se concluye que el Hitachi 717 es un equipo confiable para ser utilizado en la rutina del laboratorio clínico al presentar buena precisión, exactitud y linealidad

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Castillo de Sánchez M.L. y Fonseca Yerena M E. Mejoría Continua de la Calidad. México: Médica panamericana México. (1997): 53-55.
- 2.- Mauleón S. F, Pedraza P. J. Validación de tres métodos analíticos en Química Clínica. Tesis para Lic. Q.F.B. FES Zaragoza, UNAM. 1995:3-7.
- 3.- Ley General de Salud, Décimo Tercera Edición, México, Porrúa, 1996.
- 4.- Plaut D, Silverman J, Terres A. Monografía de Control de Calidad. Florida 1991:1-6.
- 5.- A-Cockayne. Química Clínica. México Interamericana. Mcgraw-Hill. 1995:40-60, 112-118.
- 6.- Henry J. R. Química Clínica. Principios y técnicas. Tomo I, 2da. edición. Barcelona JIMS. Barcelona, 1980: 285-323, 339-341.
- 7.- Henry , M.D. Diagnóstico y tratamiento clínico por el laboratorio. Salvat. Barcelona, 1986: 50-69.
- 8.- Sonnenwirth A.C, Jarett L, Clinical Laboratory Methods and Diagnosis, 8th ed. Editorial Gradwohl's. St. Louis. CV Mosby, 1980:175-176
- 9.- Buttner J, Borth P, P. M. G. Broughton, R C, Bowyer.: Control de Calidad. Bioquimia. 1980: 17; 504-511.
- 10.- Castillo del Valle M. L. " El Proyecto México de Química Clínica I. Bioquimia, 1988. 1; 25-26.
- 11.- León Fierros E. Validación del método analítico como control de calidad para la cuantificación de la 5-7-B-Hidroxiquinoleína en tabletas. Tesis para Lic. Q.F.B. ENEP Zaragoza, UNAM. 1988:6-16.
- 12.-Camarillo Cruz P. Validación de un método analítico para cuantificar peróxido de benzoilo en un gel por yodometria. Tesis para Lic. Q.F.B. ENEP-Zaragoza, UNAM. 1989:2-10.
- 13.- Guías oficiales de validación de la Dirección General de Control de Insumos para la la Salud, SSA. 1988. 1-47.

- 14.- CLIA 88. A Summary of the Major Provisions of the Final Rules, Implementing the Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988. Maloney.P. Met Path; Corporate Medical Services.1990, 120-135.
- 15.- Sarfraz A, Siddiqui, M, and Mehdi A, Mirza, M, C (ASCP).: Evaluation of the BM/Hitachi 717 Clinical Chemistry Analyzer in a Third World Country. Clin Chem 1990;35;1260.
- 16.- Biosca Carmen, Antoja Felipe, Sierra Cristina and Douezi Helene. Evaluation of the Hitachi 717 analyzer. J of Automatic Chem 1989;11;159-163.
- 17.- Cabral de Vargas M. Proyecto México de Química Clínica II . Distribución de Sueros y Evaluación de Datos Bioquímica, 1988:1;(1),25-33.
- 18.- Castillo del Valle . M. L . Proyecto México de Química Clínica III. Cursos Básicos de Entrenamiento para Tutores en Química Clínica en Cascada Bioquímica, 1988:13;(3), 25-29.
- 19.- Castillo de Sánchez, M. L, Valencia Font, E.: Proyecto Encuesta entre 26 Laboratorios Clínicos del Istmo Centroamericano con la finalidad de medir la Precisión y la Exactitud previamente al establecimiento de Sistemas de Control de Calidad Global Bioquímica.1991:17;(63), 17-23.
- 20.- Vargas de Cabral M, Castilllo de Sanchez Ma Luisa, Alva Estrada S. Resultados de la Evaluación Externa de la Calidad en las Determinaciones de Glucosa y Colesterol II. Bioquímica, 1989:14;(3), 27-34.
- 21.- Bertrand L. Hansen, Prabhakar M. Ghare. Control de Calidad Teoría y Aplicaciones, 2ed, Ed Díaz De Santos, Madrid España 1990:1-6.
- 22.- Kaplan L, Pesce A: Química Clínica. Técnica de Laboratorio. Fisiopatología. Métodos de análisis.Buenos Aires Médica Panamericana. 1986:127.
- 23.- Villafuerte R. L. La Enseñanza del Control de Calidad en el IPN (Industria Farmacéutica). Rev Méx de Ciencias Farma. 1987:3;5-11.
- 24.- Méndez. R L , Namilira G D, Moreno A L, Sosa de M. C. El protocolo de investigación. 2da. edición, México Trillas. 1987:158-160.

25.- Gragfmexer D, Bondon M, Manchon M, Levillain P. The influence of bilirubin, haemolysis and turbidity on 20 analytical test performed on automatic analysers. Results of an interlaboratory study. Eur J Clin Chem Clin Bioche. 1995;33(1): 31-52

26 - Bowers G N. Accuracy and blood cholesterol measurements. Clin Chem. 1975; 7:21.

27. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of the linearity of quantitative analytical methods. Document EP6-P. 1991;6:(18): 1-58.

28.- Garber C C. Evaluation of the linearity of quantitative analytical methods NCCLS-EP6. 1991; 31-40.

29. Siest G, Galteau M, Schiele F. Interferencias analíticas y variación Farmacológica. Barcelona Doyma. 1987;237-239

30.- Gonzalez de Buitrago José Ma.: Tecnología y Métodos del Laboratorio Clínicos. 2ed, Barcelona Salvat. 1992;267-296.

31.- Granovillet R, Rasele F, Sicallac M. Urinary sodium, potassium, calcium, urea and creatinine determination by Ektachem 250. Clin Chem. 1990;5;1-40

32.- Folleto Perfil Automatización una Visión Integral. Lakeside-Boehringer Mannheim. 1987

33.- Lifshitz M, DeCresce RP. Clinical laboratory instruments selection. Lab Med 1990;21:367-370

34 Leary N O, Pembroke A, Duggan P F .Improving accuracy of glucose oxidase procedure for glucose determintions on discrete analyzers. Clin Chem. 1991;38(2):25-32.

35 - Haeckel R, General principles for the classification of analysers. J of Automatic Chem1988;10(4):164-166.

36.- Holownia P, J Newman D, Bruno C, LaGamba P, Gerrits M, Salemink G. Automated dibucaine number measurement with DuPont Dimension. Es and AR Analyzers. Clin Chem 1995,41(5):664-667.

- 37.- Dimeski G, Cheung K, Ormiston B. Interference from bicarbonate reagent in magnesium measurements on the BM/Hitachi 747. Clin Chem 1994,40(5):851-852.
- 39.- Osselaer J C, Lievens M M, More on Interference of bilirubin in creatinine determination by Hitachi 717 Analyzers. Clin Chem 1991;(37)8:1460-1461.
- 40.- Maffetone M A, Watt S W, Whisler K E Automated specimen handling: Bar codes and robotics. Lab Med. 1990;21: 436-443.
- 41.- Burtis C A. Factors influencing evaporation from sample cups, and assessment of their effect on analytical error. Clin Chem 1975;21:1907-1917.
- 42.- Dawson-Saunders B, Trapp G R. Bioestadística Médica. México El manual moderno. 1993:42-50.
- 43.- The Merck Index, Eighth Edition, New Jersey: Merck Co, Rahway, (1985):?
- 44 -Zilva M J, Pannall R P: Clinical chemistry in diagnosis and treatment. year book Chicago: Medical publishers 1971: 125-149.
- 45.- Tietz NW. Clinical Guide to Laboratory Test. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Co. 1990:234-242.
- 46.- *Manual de Instrucciones para el modelo HITACHI 717, analizador automatizado* 1980.
- 47.- Inserto del Fabricante. Método GOD-PAP en suero y plasma. Test-color enzimático. SYS 2 BM/Hitachi 717/911.Boeringer Mannheim.
- 48.- Inserto del Fabricante. Suero de Calibración Calibrator for Automated systems .SYS 2 BM/Hitachi. Boeringer Mannheim.
- 49.- Clinical significance of test available from DuPont. There a lot of good chemistry between us. Inglaterra 1978: 68-80.
- 50.- Inserto del Fabricante. Urea Método UV cinético en suero y plasma. Test-color enzimático. SYS 2 BM/Hitachi 717/911.Boeringer Mannheim.

- 51.- Folin O, Denis W A new (Colirimetric) method for the determinacion of uric acid in blood. J Biol Chem 1912;(13):469-475.
- 52.- Inserto del Fabricante. Método modificado uricasa en suero y plasma. Test-color enzimático. SYS 2 BM/Hitachi 717/911.Boeringer Mannheim.
- 53.- Jaffé M, Ueber den Niederschlag welchen pikrinsaure in normale Harm erzeugt und uber eine neue reaction des Kreatinins, Z Physiol Chem.1886;10:391.
- 54.- Bowers L D, Wong E T. Kinetic serum creatinine assays, II. A critical evaluation and review. Clin Chem 1980;26:551-554.
- 55.- Inserto del Fabricante. Método de Jaffé con blanco de twin en suero y plasma. Test-color enzimático. SYS 2 BM/Hitachi 717/911.Boeringer Mannheim.
- 56.- Abell L L, Levy, B B., Brodie, B. B., and Kendall, F. E.; A simplified method for the estimation of cholesterol in serum and demonstration of its specificity. J. Biol. Chem. 1952:195;357.
- 57.- W Richmond.: Preparation and Properties of a Cholesterol Oxidase from Nocardia sp. and its Application to the Enzymatic Assay of Total Cholesterol in Serum. Clin. Chem. 1973:19;12,1350.
- 58.- Bachorik, P: S., Wood, P.D.S., Williams, J., Kuchmak, M., Ahmed, S., Lippel, K , and Albers, J.: Automated determination of total plasma cholesterol: A serum calibration technique. Clin. Chim Acta 1979:96;145.
- 59.- Inserto del Fabricante. Método CHO-PAP en suero y plasma. Test-color enzimático. SYS 2 BM/Hitachi 717/911.Boeringer Mannheim.