



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESPECIALIZACIÓN EN BIOQUÍMICA CLÍNICA**

**VERIFICACIÓN DE LA HEMOGLOBINA RETICULADA EN EL EQUIPO DE ABBOTT-  
ALINITY hq Y LA DETERMINACIÓN DE LOS VALORES DE REFERENCIA EN UNA  
POBLACIÓN ADULTA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LA UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**TESINA**

QUE PARA OBTENER EL:

**GRADO DE ESPECIALISTA**

EN:

**BIOQUÍMICA CLÍNICA**

PRESENTA:

**Q.C RUTH SANTIAGO SANTIAGO**

TUTORA

**MLH. MARÍA DEL ROSARIO SALAZAR RIOJAS**

**CIUDAD UNIVERSITARIA., CD. DE MÉXICO, 2023**



**FACULTAD DE QUÍMICA**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **ABREVIATURAS**

%CV: Porcentaje de Coeficiente de Variación

%RETIC: Porcentaje de reticulocitos

%rP: Porcentaje de plaquetas reticulocitarias

CCI: Control de Calidad Interno

CIL: Comparación interlaboratorios

CLIA: Las enmiendas para la mejora de laboratorios clínicos

CLSI: Instituto de estándares clínicos y de laboratorios

dL: decilitros

ema: entidad mexicana de acreditación

Etp: Error total permitido

g: gramos

GI: Grados de libertad

Hgb: Hemoglobina

HiCN: Hemoglobina en Ciametahemoglobina

HTC: Hematocrito

HU: Hospital Universitario

IFCC: Federación internacional de Química Clínica y Medicina de

Laboratorio

IR: Intervalos de referencia

IRF: Fracción de reticulocitos inmaduros

ISD: Índice de Desviación Estándar

ISO: Organización Internacional de Normalización

JCTML: El comité conjunto para la trazabilidad en medicina de laboratorio

K<sub>2</sub>EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético Dipotásico

MCH: Hemoglobina corpuscular medio

MCHC: Concentración de hemoglobina corpuscular medio

MCHr: Hemoglobina reticulada corpuscular medio

MCV: Volumen corpuscular medio

MPV: Volumen plaquetario medio

N: Tamaño total de la muestra

NCCLS: Comité Nacional de Normas del Laboratorio Clínico (ahora CLSI)

OMS: Organización Mundial de la Salud

PEA: Programa de Ensayos de Aptitud

PIV: Índice de Varianza

PLT: Plaquetas

Q: Cuartil

RBC: Índice de glóbulos rojos

RDW: Dispersión del tamaño del eritrocito

RETIC: Reticulocitos

RIC: Rango Intercuartil

RNA: Ácido ribonucleico

S: desviación estándar/  $\sigma$

Sig: significancia

UANL: Universidad Autónoma de Nuevo León

UB: Incertidumbre del material de referencia

Uc: Incertidumbre combinada

Uexp: Incertidumbre expandida

Ur: Incertidumbre por repetibilidad

VR: Valores de Referencia

## RESÚMEN

El presente trabajo de estudio tiene por objetivo evaluar y demostrar el desempeño clínico de un parámetro que no ha tenido gran impacto en México y cuyo nombre es “Contenido de Hemoglobina reticulocitaria” por sus siglas en inglés MCHr. La MCHr ha ganado un gran interés en la detección oportuna de diversas enfermedades entre las principales la anemia ferropénica, y cuya importancia radica en la valoración diagnóstica mediante el análisis de una biometría hemática. El protocolo consiste en verificar la MCHr en el equipo de abbott-Alinity® y determinar los valores de referencia en una población adulta sana de un hospital de tercer nivel en México. Para cumplir con los puntos de verificación que son: precisión, linealidad, veracidad e incertidumbre y llegar a determinar los intervalos de referencia, se emplearon herramientas como la guía de la Entidad Mexicana de Acreditación (ema) y la *Clínica an laboratory standards institute (CLSI)*. Para la determinación de los intervalos de referencia, se analizaron 169 hombres y 122 mujeres que acudieron al Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) en la ciudad de Monterrey NL. Se utilizó el método no paramétrico de Tukey para las detecciones de valores extremos y se determinaron los IR de acuerdo al EP28.A3c de la CLSI. En cuanto a los resultados obtenidos se observó la variabilidad del intervalo calculado con respecto al IR sugerido por el fabricante. El desplazamiento y los cambios de amplitud comprueban una dispersión no significativa y la relación entre ambos géneros tienen correlación significativa. La importancia de verificar la MCHr y determinar el método en el laboratorio ayuda a la certificación y acreditación de la misma ante entidades internacionales.

## 1. INTRODUCCIÓN

En los laboratorios clínicos el paso determinante para la validación y acreditación en los resultados emitidos es apearse a las normativas nacionales en concordancia con las normas internacionales para cumplir con los requisitos de calidad y competencia técnica de los laboratorios clínicos. En México la Entidad Mexicana de Acreditación (ema) y el organismo Internacional ISO 15189:2022/NMX-EC-15189-IMNC-2015 norma actual vigente, mencionan que para la verificación de métodos analíticos, el laboratorio debe disponer de un procedimiento detallado para asegurar el cumplimiento del análisis antes de comenzar a utilizarlos, y así poder alcanzar el desempeño requerido según lo declarado por el fabricante o el método a implementar, con ello el sector sanitario aumenta la confianza en las decisiones de diagnóstico. Otro punto indispensable que se declara es poder determinar los valores de referencia biológicos y los límites de decisión clínica, logrando registrar las bases que los justifican y reflejar el tipo de población con el que se enfrentan, teniendo en consideración el riesgo para los pacientes hacia dónde va enfocada la población en estudio. Con todo ello hoy en día se cuentan con guías y protocolos como la CLSI y la misma ema donde detallan los puntos a seguir para la verificación de métodos que son: Precisión, Linealidad, Veracidad, Incertidumbre e IR<sup>1,2</sup>. Para ello, los laboratorios deben ser capaces de definir dos conceptos importantes: la validación de un método que consta de una serie de procedimientos que permite saber cuál va a ser el uso previsto de un sistema de medición, confirmando su efectividad mediante el suministro de evidencia objetiva de que se ha cumplido los requisitos del método para su aplicación específica prevista, y la verificación que mediante una serie de protocolos, nos permite obtener evidencia objetiva de los requisitos especificados del fabricante y que estos se cumplan, es decir; demostrar que cumpla con los requisitos especificados como resultado de su validación<sup>3</sup>.

Una vez planteado las definiciones surge una pregunta ¿Qué se requiere para implementar un nuevo método? su validación o su verificación, y es aquí donde estos conceptos nos pueden confundir. El objetivo de validar la verificación de los métodos analíticos es conocer la magnitud del error del método y si este error puede ocasionar variaciones en la interpretación de los resultados y así repercutir en el diagnóstico del paciente. Por lo que la verificación permite saber si el método es útil como herramienta diagnóstica<sup>4</sup>.

### **1.1 BIOMETRÍA HEMÁTICA**

La biimetría hemática o también conocida como hemograma consiste en un análisis sanguíneo donde reúne las mediciones en valores absolutos y porcentuales de las tres poblaciones celulares de gran importancia que son: leucocitos, eritrocitos y plaquetas, al igual que la evaluación morfológica mediante un extendido sanguíneo. Estas células sanguíneas producidas en la médula ósea pasan a la circulación para cumplir una función específica. La visualización de un hemograma por parte de un experto es indispensable, ya que existen alteraciones que corresponden a enfermedades que tienen origen hematopoyético siendo consecuencia de modificaciones patológicas de diferente naturaleza<sup>5</sup>.

En la actualidad los laboratorios clínicos han incorporado autoanalizadores hematológicos que basan su funcionamiento en métodos de alta precisión como, por ejemplo: ópticos, de impedancia, citometría de flujo y que tienen como base el proceso del recuento y caracterización de las líneas celulares hematológicas. Debido a la diversidad de enfermedades hematológicas el surgimiento y la comercialización ha puesto a la mira en médicos y especialistas el estudio estricto de la citometría de flujo más integral, precisa, confiable y cuyos resultados sean el punto clave para la orientación diagnóstica, pronóstica y evolutiva de los trastornos hematológicos<sup>6</sup>.



## 1.2 PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS CON RELACIÓN AL MCHr

### 1.2.1 Hemoglobina reticulocitaria (MCHr)

La hemoglobina reticulocitaria conocida por sus siglas en inglés como *Reticulocyte Hemoglobin Content* (CHr), *Ret-He* (*Reticulocyte Hemoglobin Equivalent*) y *CMHr* (*Reticulocyte Hemoglobin Concentration*) es un nuevo parámetro que ha cobrado un gran impacto clínico en el estudio hematológico. Dicho parámetro es exclusivamente de los autoanalizadores de hematología de VI generación, por mencionar algunos: Advia® 120 y Advia® 2120 de la compañía Siemens (Erlangen, Alemania) y de los modelos XE y XN de los equipos de Sysmex® Corporation (Kobe, Japón), entre otros de reciente validación como son Abbott-Alinity® Estos equipos determinan la concentración de hemoglobina presente en los reticulocitos y lo miden en picogramos como unidad de medida<sup>7</sup>.

En el caso de la hemoglobina los automatizadores miden por fotometría (540 nm) la hemoglobina y lo reportan en g/dL es el parámetro de importancia diagnóstica para las anemias. Actualmente existen otros métodos entre los que destacan: el método de la azida-MetHb, la cooximetría y el método de Lauril sulfato sódico<sup>8</sup>.

Para que se entienda de que se trata cuando se habla de la MCHr se refiere a la concentración de la hemoglobina que alberga en los reticulocitos, lo que en los eritrocitos se refiere a la concentración de hemoglobina corpuscular (HCM). Al medir la MCHr hace referencia al índice de eritropoyesis de las últimas 48 a 72 horas, en tanto que la concentración de hemoglobina corpuscular es de 120 días lo que representa la vida media de los reticulocitos y de los eritrocitos<sup>5,6</sup>. Con base a lo anterior, la MCHr prevee anticipación sobre la eritropoyesis antes de que se vea reflejada en el incremento o disminución de la hemoglobina o de los reticulocitos

por lo que esta información apoya a las decisiones clínicas como la respuesta terapéutica en distintos trastornos, principalmente en casos de anemias y sobre la eritropoyesis en médula ósea. Autores señalan que el MCHr es el marcador más directo de una adecuada síntesis de hemoglobina<sup>9</sup>.

Lo interesante de destacar es el método por el cual el equipo realiza el cálculo de la MCHr y lo obtiene mediante el producto de la concentración de la hemoglobina y el volumen de los eritrocitos. Por lo que primero es importante calcular el volumen celular de referencia en los eritrocitos y en los reticulocitos. Mediante la técnica de dispersión de la luz frontal se establece la señal proporcional al tamaño de los eritrocitos (RBC-Y) y otra proporcional al tamaño de los reticulocitos (RET-Y). Para medir el diámetro se induce a que las células adopten una forma esférica y luego se lee la dispersión de la luz en ángulos diferentes, uno alto (5° a 20°), que ofrece información sobre la refracción celular y otro bajo (2° a 3°) que proporciona al volumen celular. Una vez obtenido las mediciones se calcula el volumen celular de los reticulocitos en femtolitros. A partir de este punto de referencia y de la tinción de su material genético RNA, se pueden diferenciar ambas poblaciones y calcular el promedio de hemoglobina reticulada en picogramos, con base a lo descrito anteriormente. Si bien el principio se describió general, hoy en día el método utilizado varía según el auto analizador de hematología y los principios de medición que aplique cada uno de ellos. Dadas estas diferencias surgió la interesante pregunta sobre si los valores de la MCHr son comparables entre las diferentes metodologías. Existen estudios donde ya han determinado correlación entre los valores obtenidos de diferentes equipos como son Advia® y Sysmex®<sup>9,10</sup>.

La llegada del sistema Alinity es una reciente familia de equipos en México, es por ello que aún no se tiene bien establecidos los valores de referencia de la MCHr en la población del Norte del país, donde el objetivo es la verificación a partir de la validación. Sin embargo, otros países como Colombia, Perú, Europa han utilizado equipos de VI generación donde establecen de acuerdo a la literatura sus valores de referencia oscilando entre 31,9 y 41,6 pg. Es importante mencionar que para cada población es diferente y es ahí la importancia de establecer los propios valores de referencia<sup>11</sup>.

#### 1.2.1.1 Variabilidad

La MCHr es un parámetro derivado del volumen celular y que puede ser afectado especialmente por la concentración de la muestra, temperatura y almacenamiento. Con el equipo de Sismex XN 9000 se ha observado estabilidad en los resultados cuando la muestra se conserva en refrigeración entre los 2° y 4°C durante las 48 horas. De acuerdo a la literatura los valores de variabilidad biológica para la MCHr se encuentran entre 24.1 a 35.8 pg. cuando se habla de una deficiencia de hierro se encuentra por debajo de 26 pg. Un contenido inferior a 29 pg. predice deficiencia de hierro en pacientes tratados con agentes estimuladores de la eritropoyesis, un valor mayor a 30.6 pg. se considera predictivo de respuesta a tratamiento con hierro intravenoso en personas con diálisis<sup>9,12</sup>.

#### 1.2.1.2 Utilidad clínica de la Hemoglobina reticulocitaria

Existen centenares de artículos y publicaciones que corroboran a la MCHr como una valiosa herramienta para el diagnóstico y manejo de la eritropoyesis deficiente en hierro llevando a padecer una de las enfermedades más recurrentes en el mundo y la principal causa de anemia en México: “La anemia ferropénica”. Es muy evidente que, en poblaciones de bajos recursos,

pediátricos, embarazadas y adultos mayores padezcan estas deficiencias absolutas de hierro. Con ayuda de la determinación de la MCHr, han podido dar un riguroso seguimiento de la terapia con hierro, y esto se debe a que cuando se está pasando por una deficiencia de hierro los niveles de la MCHr disminuyen rápidamente. Estudios redactan que la hemoglobina reticulocitaria tiene una sensibilidad del 93 % y una especificidad del 83.2% para el diagnóstico de anemia ferropénica<sup>13,14</sup>.

Sin embargo, en 1997 Fishbane *et al*, evaluaron el contenido de la MCHr sobre el estado de metabolismo del hierro en 164 pacientes en tratamiento con hemodiálisis, concluyendo un 100% de sensibilidad y 80% de especificidad para este parámetro<sup>15</sup>.

En 2020 Mast et al, realizaron un estudio donde evaluaron la utilidad clínica de la MCHr para el diagnóstico de deficiencia de hierro en 78 pacientes, de los cuales el 36% presentaron deficiencia de hierro con un rango de 21 a 38.6 pg. mientras que en pacientes sanos el rango de la MCHr fue de 22.8 a 43.7 pg<sup>16</sup>.

Se desea encontrar un biomarcador que permita una correcta diferenciación entre la anemia por deficiencia de hierro, anemia por enfermedades crónica y la anemia por enfermedad crónica por deficiencia de hierro. Además, la determinación de la MCHr ha resultado de gran utilidad clínica no solo en lo ya mencionado si no también en el diagnóstico de procesos inflamatorios, en pacientes con cáncer y monitoreo de procesos de recuperación durante los esquemas de quimioterapia y en pacientes con insuficiencia renal crónica que requieren diálisis, que al igual reciben como parte integral de su manejo de eritropoyetina. En este sentido se recomienda que, durante la monitorización, los valores de MCHr sirva para definir si se debe suministrar hierro al paciente hemodializado, y mantener un valor dentro de los parámetros normales<sup>17</sup>.

Se ha observado que en cuanto al tratamiento de paciente con anemia por deficiencia de hierro la MCHr aumenta gradualmente hasta alcanzar niveles normales mucho antes de que se evidencien los cambios del metabolismo del hierro como la ferritina. De igual manera es un indicador para aquellos que no responden al tratamiento oral con hierro y requieren por el método parental<sup>18</sup>.

### 1.2.2 Índices eritrocitarios

Por casi 30 años los índices eritrocitarios por Wintrobe indican con precisión el diámetro de un eritrocito promedio, el volumen, peso y la concentración de la hemoglobina.

- Volumen corpuscular Medio (VCM)

Es un valor calculable por medio de la formula siguiente.

$$\frac{\text{Hematocrito}}{\text{recuento eritrocitos}} (10) = \text{femtolitro} (10^{-15} FL)$$

Y corresponde al promedio del volumen de cada eritrocito. Permite clasificar el diámetro del eritrocito en macrocitosis, microcitosis o normocitosis.

- Hemoglobina corpuscular medio (HCM)

Parámetro calculable mediante la siguiente formula

$$\frac{\text{Hemoglobina}}{\text{recuento eritrocitos}} (10) = \text{picogramo} (10^{-12} g)$$

Y expresa la carga media de hemoglobina de cada eritrocito, este parámetro permite clasificar a los eritrocitos en hipocrómica o normocítica.

- Concentración corpuscular media de hemoglobina (CHCM)

Parámetro calculable mediante la siguiente fórmula

$$\frac{\textit{Concentracion de Hemoglobina corpuscular media}}{\textit{Hematocrito}}(100) = \%$$

Los recuentos celulares y la hemoglobina pueden ser medidos en forma directa por los autoanalizadores utilizando varios métodos como impedancia, difracción de luz láser entre otros, sus sistemas de cálculo integrado permiten obtener los índices eritrocitarios en forma automática. La evaluación más frecuente que se encuentra al interpretar un hemograma es la anemia. El uso de la correlación de estos índices eritrocitarios permite orientar la búsqueda etiológica, clasificando así la anemia como: normocítica-normocrómica, microcítica-hipocrómica, macrocítica, regenerativa o arregenerativa<sup>19,20</sup>.

### **1.3 ANEMIA**

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) la anemia es una de las deficiencias graves de salud pública a nivel mundial. Entre ellos se calcula que alrededor de 800 millones son niños menores de 5 años y mujeres embarazadas, su prevalencia se ha mantenido estable entre el 41.9% (2011) y un 41.7% (2016).

La anemia es un trastorno en la que el número de eritrocitos o la concentración de hemoglobina que tiene la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre es insuficiente para abastecer las necesidades del organismo. Entre las anemias más comunes son las que carecen de un estado nutricional, particularmente de hierro, aunque no menos importante las de folatos, vitamina B12 y A1. El principal interés de validar la concentración de la hemoglobina en los equipos

automatizados es la valiosa información de decisión clínica para la prevención de anemias. La prevalencia de anemia por deficiencia de hierro es un indicador de importancia sanitaria ya que con otras determinaciones pueden evaluar el estado nutricional del paciente <sup>21</sup>.

### **1.3.1 Anemia ferropénica**

Conocida también como anemia por deficiencia de hierro, la aparición de la anemia es la última etapa de las reservas de hierro, donde la producción de hemoglobina está comprometida y por consiguiente la supervivencia de los eritrocitos debido a la deficiencia de hierro. En el reporte del extendido sanguíneo se visualiza a los eritrocitos con microcitosis e hipocromía, la evidencia bioquímica del agotamiento de las reservas de hierro esta medida por reacciones bioquímicas de rutina como: perfil de hierro (hierro en suero, transferrina, ferritina), sin embargo, el estándar de oro en la actualidad es un aspirado de médula ósea para su posterior tinción con el colorante de azul de prusia. Hoy en día ha perdido vigencia debido al riesgo invasivo que se requiere para realizar para su diagnóstico. La falta de hierro puede ser absoluta cuando hay una reducción real de hierro corporal total en el organismo o funcional cuando en el organismo no se aprovecha adecuadamente para la eritropoyesis. Por consiguiente, si no se aprovecha adecuadamente la hemoglobina que se encuentra en los glóbulos rojos será deficiente, Tabla 1 <sup>22</sup>.

Tabla 1 Marcadores de los niveles de normalidad y deficiencia de hierro

Marcadores de almacenamiento	Niveles de normalidad	Deficiencia de hierro
Hierro sérico <sup>(19)</sup>	Hombres: 50-160 ug/dL Mujeres: 60-150	Disminuido
Almacenamiento de médula ósea <sup>(20)</sup>	En condiciones normales se observan sideroblastos en cuyo interior aparecen de 1 a 4 gránulos en el citoplasma.	Disminuido
Capacidad total de fijación de hierro <sup>(21)</sup>	205-400 ug/dL	Aumentada
Protoporfirina zinc eritrocitaria <sup>(19)</sup>	0 - 70 µg/dL	Aumentada
Ferritina sérica <sup>(19)</sup>	Hombres: 15-400 ng/mL Mujeres: 10-106 ng/mL Niños: 10-106 ng/mL	Aumentada *Por ser una proteína de fase aguda, los niveles aumentan en estados de inflamación aguda o crónica, neoplasias, hepatopatías.
% de saturación de la transferrina <sup>(19)</sup>	Límite inferior 6 meses a 6 años: 9% 7 años-12 años: 11% Adultos: 16%	Disminuida
Hepcidina <sup>(22)</sup>	hombres: 2,1-15,1 nM mujeres: 1,6-15,6 nM	Aumentado
Receptor soluble de la transferrina <sup>(23,24)</sup>	8.7-28.1 nmol/L	Aumentada
Hemoglobina reticulocitaria <sup>(25)</sup>	>26 pg.	Disminuida < 26 pg.
Morfología eritroide <sup>(20)</sup>	Normocítica/normocrómica	Microcíticos/hipocrómicos

DOI: <http://dx.doi.org/10.22267/rus.182003.133>

#### 1.4 Abbott Alinity hq

En los últimos años se han originado importantes avances tecnológicos sobre autoanalizadores de VI generación que, gracias a la incorporación de nuevos parámetros hematológicos y bioquímicos del metabolismo férrico, como lo son: el % de reticulocitos y la MCHr permiten la detección precoz del déficit de hierro, presentando numerosas ventajas y disminuyendo el grado de error en comparación con los métodos manuales. El sistema integrado de hematología de Abbott Alinity hq ofrece hemogramas cuantitativos, multiparamétricos y automatizado que se utilizan en los laboratorios clínicos para el apoyo al diagnóstico *in vitro* del recuento de los diversos estirpes y parámetros celulares que se encuentran en la sangre periférica por mencionar algunos; WBC, NEU, LYM, RBC, HTC, HGB, MCV, MCH, MCHC, MCHr, RETIC, %RETIC, IRF, PLT, MPV, %rP, y trabaja con sangre anticoagulada en tubos de EDTA



dipotásico (K2EDTA) y tripotásico (K3EDTA). El equipo Alinity está formado por dos submódulos el hq y el hs. El hq se utiliza para identificar a pacientes con parámetros hematológicos dentro y fuera de los intervalos de referencia establecidos y que automatiza las actividades relacionadas con el procesamiento de las muestras tales como mezclado, aspiración, dilución y determinación final de los parámetros y tinción de la sangre que regularmente se realiza externamente. Y el hs prepara y tiñe las extensiones de sangre. Tan solo en México existen 4 laboratorios clínicos que determinan la MCHr con ayuda del equipo Alinity hq. Además de convertirse en un parámetro más que se enlista en el perfil de la citometría hemática, los costos de la prueba incluyendo reactivo e insumos desechables no sobrepasan más de los 60.00 pesos mexicanos. La caja que contiene 4 reactivos colorantes tiene un costo de \$9000.00 pesos mexicanos más IVA, y tiene una capacidad de 250 pruebas cada frasco dando un rendimiento total de aproximadamente 1000 reacciones<sup>23</sup>.

#### **1.4.1 Metodología**

El sistema Alinity hq utiliza dos metodologías de medición independiente:

1. Citometría de flujo: para el recuento de WBC, RBC, PLT, Y RETIS
2. Espectrofotometría: para la determinación de HGB

##### **1. Citometría de flujo:**

La citometría de flujo se define como un proceso en el cual las células o partículas biológicas se alinean en una fila única por medio de un fluido, para que, a través de un rayo de luz, uno o varios sensores determinan en función de la pérdida o del esparcimiento lumínico, las características físicas o químicas de las células o partículas, y que permite examinar rápidamente un gran número de células y un análisis cuantitativo de ellas que son medidas una por una. La

suspensión celular es bombeada desde la cámara de mezcla, a través de un conducto, hasta la celda de flujo, seguidamente se inyecta una corriente de líquido en movimiento rápido y exento de células. Como los dos líquidos viajan a una velocidad diferente, no se mezclan entre sí. Esta geometría especial de la célula de flujo y la velocidad de flujo del reactivo envolvente obliga a que las células se dispongan en una sola hilera, este proceso se denomina enfoque hidrodinámico.

## 2. Espectrofotometría de absorción

La espectrofotometría de absorción es la tecnología utilizada para medir la hemoglobina. Esta tecnología se basa en la relación lineal existente entre la cantidad de luz absorbida por una muestra homogénea, en reposo, en una determinada banda de absorción y la concentración de una sustancia que absorbe la luz en la muestra (ley de Beer). Para llevar a cabo esta metodología el sistema utiliza la dilución de hemoglobina como muestra y un complejo de hemoglobina como sustancia que absorbe la luz. Una vez diluida y mezclada la muestra se ilumina mediante un diodo emisor de luz LED a 555 nm. Un fotodetector mide la cantidad de luz que atraviesa la muestra, esta se repite varias veces<sup>23</sup>.

### **1.5 VERIFICACIÓN DE UN MÉTODO EN EL LABORATORIO CLÍNICO**

La metodología de la validación y verificación de los procedimientos del ensayo utilizados por el propio laboratorio, contemplan la satisfacción de las necesidades metrológicas requeridas por el médico y así concluir en un pronóstico y tratamiento adecuado. Un laboratorio clínico acreditado, público o privado, debe demostrar la competencia técnica para realizar las actividades de validación y verificación de los procedimientos de examen cuantitativo establecidos en su alcance de acreditación. Es por ello que la verificación demuestra las

habilidades y aptitudes de los procedimientos de examen y refleja las condiciones de su aplicación. Los datos de referencia nos informan lo validado por cada fabricante en sus respectivos instructivos de cada reactivo. No obstante, es ahí donde el laboratorio debe verificar que se pueden aplicar correctamente los métodos previo a su uso en los exámenes, bajo sus propias condiciones de operabilidad (equipo, temperatura, calibradores etc.) acumulando evidencias objetivas, para confirmar su aplicación correcta. Adicionalmente es importante que el laboratorio deba presentar una comparación disponible en bibliografía científica sobre el mismo método de medición con el propósito de asegurar la confiabilidad de la validación de los procedimientos de examen y en casos de auditoría y acreditación es primordial adjuntar evidencias en carpetas o archivos digitales. A continuación, se describen los puntos primordiales para cumplir con las especificaciones que el fabricante o diseñador del método brinda que son: Linealidad, Precisión, Veracidad, Incertidumbre e VR. Todos basados en la guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico emitido por el ema-CENAM y otras guías internacionales de apoyo como lo es la CLSI. Es importante que antes de realizar esta serie de pasos para la verificación se debe llevar a cabo la calibración analítica del equipo a utilizar, ya que los procedimientos de examen dependen de los cambios realizados, así como el registro de todo lo que se realiza a cargo de un personal calificado.

### **1.5.1 Linealidad**

De acuerdo con la ema la linealidad de un método analítico es la capacidad para poder obtener resultados que sean proporcionales y que por medio de una ecuación matemática obtener la ecuación de la recta y compararla con la concentración de analitos. Es fundamental confirmar

que utilizando el procedimiento de medición y el suministro de evidencia objetiva de los valores reportados por el laboratorio muestre un comportamiento lineal. Debe considerarse que dicha verificación toque los puntos de decisión clínica entendiéndose estos como las concentraciones de los analitos donde el medico decide entre administrar o no algún tratamiento terapéutico.

### **1.5.2 Precisión**

Grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos, utilizando una muestra homogénea, bajo condiciones establecidas. Los resultados obtenidos son una estimación del valor del mensurando. Tal estimación contiene un error de medidas que es la diferencias entre el valor obtenido y el valor verdadero del mensurando. En el error de medición tiene 2 importantes componentes:

- **Error aleatorio:** Estos errores difieren en cualquier sentido del valor medio y afectan la reproducibilidad. Se relacionan con la precisión del procedimiento.
- **Error sistemático:** error sistemático total o sesgo, es la suma de todas las fuentes de error sistemáticos que puedan existir, siendo negativos o positivos.

Estos errores pueden ocurrir independientemente unos de otros y surgir en cualquier etapa del procedimiento.

### **1.5.3 Veracidad**

Grado de concordancia existente entre la media aritmética de un gran número de resultados y el valor verdadero o aceptado como referencia.

La veracidad de un método de medición es de interés cuando es posible disponer del valor verdadero del mensurando sujeto a medición. El valor verdadero no se conoce exactamente en

algunos métodos de medición, pero es posible contar con un valor de referencia certificado para el mensurando sujeto a medición como, por ejemplo: materiales de referencia, comparación del valor de referencia certificado con los resultados obtenidos por el método de medición. Es importante mencionar que no es recomendable referirse a la veracidad como la exactitud de la medición, ya que cuando hablamos de veracidad nos referimos al desplazamiento total de un resultado con respecto a su valor de referencia, debido tanto a los efectos aleatorios como a los sistemáticos. por lo que no será tan exacto. Dentro de la veracidad existe el porcentaje de recuperación que es el cociente entra la cantidad de analito medido y el contenido en la muestra. En el caso ideal se obtiene un 100%. En mediciones experimentales puede perderse analito especialmente en el caso de tratamientos complejos de muestras con analito en cantidades traza, dando lugar a porcentajes de recuperación menores<sup>23,24,25,26</sup>.

#### **1.5.4 Incertidumbre**

Se refiere a la duda que surge con respecto al valor verdadero de una medición. La incertidumbre de la medición según lo establece el vocabulario internacional de metrología es un parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos a un mensurando a partir de la información que se utiliza. De esta forma el valor obtenido de una incertidumbre presenta el resultado como un intervalo de valores probables que permiten tomar decisiones más precisas sobre una base estadística disponible.

La NMX-EC-15189-IMNC-EC-2015/ISO 15189:2012 en el apartado 5.5.1.4 “Incertidumbre de la medición de los valores de la magnitud medida” menciona que el laboratorio deberá determinar la incertidumbre de la medición para cada procedimiento de medición y debe

especificar los requisitos de desempeño, es decir; establecer que tanto está permitido la incertidumbre con relación a lo estimado<sup>27</sup>.

### **1.5.5 Estandarización de los valores de referencia**

Cualquier resultado de análisis emitido por el laboratorio carece de interés y valor por sí mismo. Se requiere de sustento y evidencia para poder adquirir un valor o credibilidad en sus resultados. De acuerdo con Suderman F, Grasbeck y Saris en 1969 definieron el término de “valores de referencia” con el objetivo de evitar dificultades que no se entendían en aquella época ya que se referían con el termino de valores normales. Es por ello que profesionales de la salud como: médicos, químicos, ingenieros entre otros expertos, colaboraron para una interpretación más precisa para así poder decidir si se está en presencia o no de la enfermedad el paciente.<sup>28,29</sup>

Fue en 1979 que *The International Federation of Clinical Chemistry* (IFCC) definió valor de referencia como: “Un valor obtenido por observación o medición de un tipo particular de cantidad en un individuo de referencia” Años más adelante la NCCLS (Serving the World’s Medical Science Community Through Voluntary Consensus), publica una guía titulada: “How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline que incluye términos respaldados por la OMS y otras organizaciones donde define como: “intervalo entre, e incluye dos límites de referencia”, los IR pueden estar asociados a estados de salud o bien a otros estados fisiológicos o patológicos<sup>30</sup>.

Según Tylor W El termino intervalo se le asigna al conjunto de resultados que se obtienen de una población de referencia. Cuando este conjunto de datos se le aplican cálculos estadísticos para establecer límites de percentiles, el intervalo obtenido se conoce como intervalo de referencia<sup>31,32</sup>. Para seleccionar la población en estudio se requieren de personas que cuentan

con un estado de salud sana y para ello la OMS define la salud como: estado de completo bienestar físico, mental y social y no solamente la ausencia de afecciones o enfermedades. Existen múltiples publicaciones con VR para cada uno de los parámetros que constituye el hemograma. Los rangos de referencias deben ser establecidos por cada laboratorio de acuerdo a la población normal en estudio, considerando criterios de inclusión y exclusión como: sexo, edad, etnia etc<sup>33</sup>.

¿Pero cómo se puede saber si el intervalo de referencia es bueno? Para Ceriotti F el IR es bueno cuando incluye a la mayoría de la población atendida, ya que poseen características similares al grupo de referencia, por lo general, si lo relacionamos en salud, significa que si el valor obtenido está dentro del IR el paciente tendrá menos probabilidad de presentar alguna patología, mientras que si el valor esta por fuera del límite, podría padecer alguna enfermedad. Los IR están definidos con una alta especificidad para la salud (normalmente el 95% o más)<sup>34</sup>.

#### 1.5.6.1 Método de Validación de IR de acuerdo con la guía EP28-A3c del CLSI

El resultado de una prueba cuantitativa se compara con un intervalo de referencia con el fin de realizar una evaluación fisiología o un diagnóstico médico. La CLSI ha proporcionado una guía: la EP28-A3c donde se describen los requisitos para determinar, transferir y validar los intervalos de referencia asociados a la salud. La decisión final para juzgar la aceptabilidad o evaluar el rechazo del método y ser utilizada en los laboratorios requiere de la evaluación tanto del error aleatorio como el error sistemático, para así conocer el error total del método, el cual se compara con las especificaciones de calidad seleccionadas para este método. La Norma ISO 15189:2022, implementación de la directiva Europea 98/79 y la creación del comité conjunto de la rastreabilidad y medicina de laboratorio (JCTLM) que son organizaciones que respaldan mucha

de las maneras de cómo realizar la validación, verificación y establecimiento de los VR y que ayudan a la correcta interpretación de los resultados de las pruebas de laboratorio ya que son las bases fundamentales para la ayuda de toma de decisiones para un buen pronóstico y diagnóstico para el médico. Una vez aceptado el método se obtiene una valiosa información de la reproducibilidad y veracidad del sistema de medición, el paso final es la verificación de los límites de referencias para completar la información requerida para que el sistema de medición pueda ser utilizada en pacientes<sup>35</sup>.

## **2. HIPÓTESIS**

### **2.1 HIPÓTESIS NULA**

Mediante la verificación del equipo de Abbott-Alinity® y la determinación de los valores de referencia de la MCHr en una población adulta del Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León, los resultados emitidos se consideran válidos y confiables para la toma de decisiones clínicas.

### **2.2 HIPÓTESIS ALTERNATIVA**

Mediante la verificación del equipo de Abbott-Alinity® y la determinación de los valores de referencia de la MCHr en una población adulta del Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León los resultados emitidos no se consideran válidos y confiables para la toma de decisiones clínicas.

## **3. OBJETIVO GENERAL**

Verificar la hemoglobina reticulada en el equipo de Abbott-Alinity® y determinar los valores de referencia en una población adulta del Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León



#### **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Calcular la precisión, veracidad, linealidad e incertidumbre de la MCHr en el equipo de Abbott® Alinity hq.
- Establecer los IR de la MCHr en población adulta del Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Obtener la distribución de los datos de la MCHr tanto en hombres como en mujeres
- Realizar una correlación entre los datos de la MCHr-VCM y MCHr -hemoglobina en hombres y mujeres

#### **5. MATERIALES Y MÉTODO**

##### **5.1 Modalidad básica de la investigación**

- Estudio clínico, prospectivo de tipo transversal.

##### **5.2 Delimitación temporal**

- El estudio se realiza en el periodo julio-noviembre de 2022.

##### **5.3 Población de estudio**

La población en estudio estuvo conformada por adultos clínicamente sanos, mayores de 18 años que acudieron al departamento de Banco de sangre y al laboratorio del Servicio de Hematología del HU de la UANL en el periodo agosto-noviembre de 2022 y que cumplieron con los requisitos de exclusión e inclusión descritos para la donación de acuerdo a la legislación vigente para bancos de sangre en México.

## 5.4 Criterios de inclusión y exclusión

### Criterios de inclusión

- Adultos mayores de 18 años
- Sexo: Indistinto
- Adultos que de manera voluntaria aceptaran participar en el protocolo de investigación
- Clínicamente sanos
- Que cumplieran con los criterios de aceptación en la entrevista de acuerdo con la NOM-253-SSA1-2012
- Pacientes que cumplieran con los parámetros de plaquetas, hemoglobina, VCM y leucocitos normales

### Criterios de exclusión

- Los que no cumplieran con los requisitos de la NOM-253-SSA1-2012, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos
- Adultos que padecieran alguna enfermedad (oncológica o hematológica)
- Adultos que estuvieran en algún tratamiento como anticoagulantes, hierro o alguna medicación que dependiera de su salud
- Adultos que hubieran donado sangre total o cualquier componente sanguíneo durante los últimos 3 meses
- Participantes que durante el procedimiento abandonen el ensayo
- Adultos que hayan recibido una transfusión sanguínea en los últimos 2 meses
- Mujeres embarazadas o en periodo de lactancia

## **5.5 Instrumentación de apoyo**

Cada muestra será analizada por citometría de flujo y con espectrofotometría de absorción mediante el equipo integrado de hematología de Abbott Alinity hq con número de serie HQ00766. Se dispondrán de tres niveles de decisión clínica: bajo, normal y alto del control de calidad interno (CCI) del mismo fabricante con número de Lote: 21649, 21929 y 22290. Se emplearán instrumentos certificados y calibrados: pipeta automática de 1000 $\mu$ L serie 397541, CERT V-871.2022 y puntillas estériles azules.

## **5.6 Evaluación de los parámetros para la verificación**

Se evaluarán los parámetros requeridos para la verificación de acuerdo en las guías internacionales de la EMA y CLSI.

**1. Precisión:** Se efectuará en condiciones de precisión intermedia o también llamada precisión interserial, es decir; se obtendrá 20 valores de la concentración de la MCHr en días diferentes del mes correspondiente de la curva del programa de CCI. Posteriormente se realizarán los cálculos de aceptación como son  $\sigma$  y %CV. El criterio de aceptación es que el % de CV obtenida tendrá que ser menor a lo validado por el fabricante.

### **2. Linealidad:**

Se realizarán corridas por triplicado con un intervalo de 5 diluciones para una evaluación adecuada. Las diluciones se prepararán con un material de referencia certificado: CCI Alto y Bajo (Tabla.2), se procederá a efectuar el cálculo de la recta de los puntos dados, así como la  $\bar{x}$  de los valores de concentración, valor teórico, sesgo, % de error obtenido y el valor esperado (Tabla.3). La recta deberá ser lo más lineal, con un coeficiente de por lo menos del 0.99.

Tabla 2. *Cálculo de la linealidad*

Número de dilución	Proporción en volumen del control BAJO	Proporción en volumen del control ALTO	
1	1 mL	0 uL	*3
2	750 uL	250uL	*3
3	500 uL	500 uL	*3
4	250 uL	750 uL	*3
5	0 uL	1 mL	*3

\*Corrida por triplicado

Tabla 3. *Formulario para los criterios de aceptabilidad de la linealidad*

Valor teórico	Sesgo	%de error obtenido
(Media de la muestra 1 *dilución) +(Media de la muestra 5* dilución) $(\bar{x}_1 \times D) + (\bar{x}_5 \times D)$	Valor experimental-Valor teórico $\Delta x = [\bar{x} - \mu]$	$\frac{sesgo}{valor\ teorico} * 100$

D=Dilución,  $\mu$ =valor teórico

### 3. Veracidad:

Se efectuará la verificación por dos métodos. La primera será mediante la verificación con los estudios de comparación de interlaboratorios (CIL) a partir de los ensayos de aptitud (PEA), evaluando el histórico de 6 meses o participaciones en el PEA y se contrasta con los valores establecidos por el organizador del programa de ensayo, considerando que, si los valores están

reportados por ISD (índice de Desviación estándar) el criterio debe ser menor a 1.0 en los 6 periodos y si están reportados por PIV (Índice de varianza) tiene que ser menor a 100. La segunda forma de verificar la veracidad es mediante la obtención de los valores esperados de los materiales de referencia ensayados. Se utilizará el material de referencia y se someterá a examen 10 veces y se estimará la concentración media del analito y con el valor obtenido se podrá determinar el porcentaje de recuperación<sup>36</sup>

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

El porcentaje de recuperación tiene que ser igual o lo más cercano a 100. Valores menores indican menor cantidad recuperada del analito cuantificado y a mayor porcentaje mayor cantidad del analito recuperado. El criterio de aceptación es que el valor sea menor o igual al reportado por el fabricante del instrumento.

#### **4. Estimación de la Incertidumbre:**

1. Para la estimación de la Incertidumbre se emplearán los resultados de 20 valores de la curva de un CCI del mes correspondiente, y se efectuarán los cálculos descritos en la NMX-EC-17025- IMNC-2017 y NMX-CH-140-INMC-2002 “Guía para la expresión de incertidumbre en las mediciones”, con el siguiente formulario en la tabla.4<sup>37,38</sup>.

Tabla 4. Formulario de la estimación de la incertidumbre

Incertidumbre por repetibilidad ( $U_r$ )	Incertidumbre del material de referencia ( $U_B$ )	Incertidumbre expandida
$S^2 = \frac{1}{n-1} \left( \sum (X_i - \bar{X})^2 \right)$	Con un nivel del 95%, entonces $k=2$ $U_B = \text{Incertidumbre del control} / 2$	$U_{\text{exp}} = k * (U_c)$ $k=2$
$U_r = \sqrt{S^2}$	<b>Incertidumbre de reproducibilidad (<math>U_R</math>)</b> $U_R = \text{PIV} / 100$	
	Incertidumbre combinada ( $U_c$ ) $U_c = \sqrt{(U_r)^2 + (U_B)^2 + (U_R)^2}$	

## 5. Valores de referencia

### 5.1 Tamaño de la muestra

Para la estandarización de los intervalos de referencia en hombres y mujeres, serán obtenidos de una población clínicamente sana, se seleccionarán en función a los resultados de las encuestas de inclusión-exclusión aplicadas a los potenciales participantes de acuerdo a los lineamientos de selección del protocolo CLSI apartado EP28-A3C y de la NOM 253-SSA1-2012. El número de pacientes en estudio será respaldado por el cálculo del tamaño de la muestra a partir de la estimación de la media poblacional.

$$N = \frac{(Z\alpha)^2(\sigma)^2}{\delta^2}$$

N=Tamaño de la muestra

( $Z\alpha$ )=Distancia de la media del valor de significancia propuesto

$\sigma$ =Desviación estándar de la población

$\delta^2$ =precisión o magnitud del error que estamos dispuestos a aceptar

De acuerdo a la literatura publicada por Ibañez-Alcade. Met. al, la media para el parámetro de la MCHr fue de  $31.6 \pm 1.3$  pg., con una precisión de 0.15 pg. Con la finalidad de obtener un nivel de significancia a dos colas del 5% y un poder estadístico del 97.5%<sup>39,40</sup>, da un total de 289 sin embargo considerando un 13% de pérdida da un total de 327 sujetos de investigación requeridos para el estudio.

## **5.2 Permisos éticos**

El protocolo de estudio incluirá una entrevista confidencial con ayuda de un doctor especialista donde se detalla el objetivo del proyecto y deberá firmar un consentimiento informado donde el participante da su autorización. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética e investigación del HU de NL. con clave de registro HE22-00027.

## **5.3 Obtención de la muestra**

Se obtendrán muestras de sangre total por la técnica de venopunción estándar de la guía CLSI H3-A2 empleando tubos con EDTA-K2. Se tendrá un estricto cuidado en la integridad de la muestra, como: temperatura, número de inversiones para evitar coágulos en la muestra, al igual que su estabilidad, procesándola dentro de las primeras 4 horas después de su toma.

## **5.4. Detección de valores extremos**

Se detectarán los valores extremos de la variable MCHr por cada grupo con el método no paramétrico de Tukey. Que consiste en calcular el cuartil inferior (Q1, percentil 25%) y superior (Q3, Percentil 75%) del conjunto de datos así también como el Rango Intercuartil (RIC)

obtenido de la sustracción Q3-Q1. Después se calcularán los límites superiores e inferiores de acuerdo a la siguiente formula:

$$\text{Límite inferior} = Q1 - 1.5 \times \text{RIC}$$

$$\text{Límite superior} = Q3 + 1.5 \times \text{RIC}$$

Los datos ubicados fuera de cualquiera de los límites se consideran como valores aberrantes y no se contemplan para los intervalos de referencia.

#### **5.4. Determinación de los intervalos de referencia**

Se determinarán los valores de referencia inferior (percentil 2.5%) y superior (percentil 97.5%) en mujeres y hombres, mediante la siguiente fórmula<sup>41,42</sup>.

$$\text{Límite de referencia inferior} \quad r_1 = 0.025 * n + 1$$

$$\text{Límite de referencia superior} \quad r_2 = 0.975 * n + 1$$

#### **5.5 Análisis estadístico**

Los datos serán sometidos a evaluaciones estadísticas, ejecutados con ayuda de los programas estadísticos IBM SPSS® y Excel Microsoft 2017. En primera estancia la distribución de las variables se determinará realizando la prueba de normalidad de Kolmogórov-Smirnov con un nivel de significancia del 0.05, y confirmándolo mediante el uso de gráficos de caja y bigotes. Si los datos cumplen con una distribución no normal, la correlación entre las variables aleatorias continuas MCHr-Hemoglobina y VCM se efectuará con la correlación Rho de Spearman por



cada grupo. Se hará uso de las reglas de interpretación del coeficiente de correlación<sup>43</sup> con una significancia del 0.01.

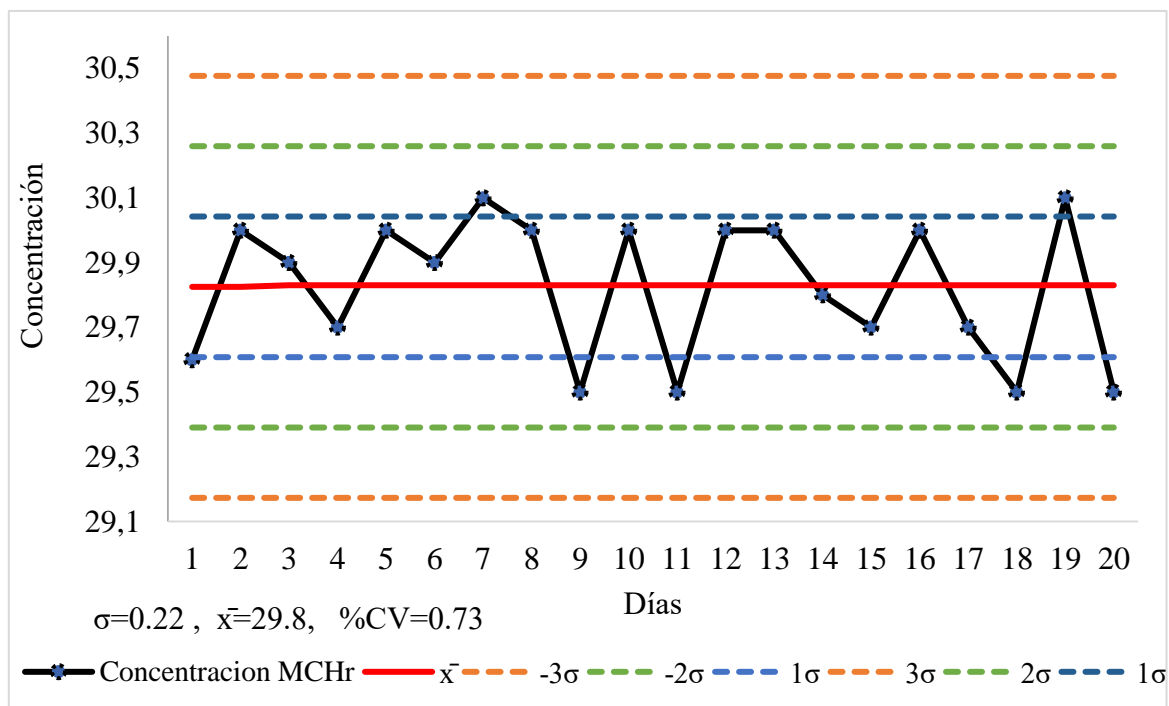
## 6. RESULTADOS

En lo siguiente se muestran los resultados de linealidad, veracidad, precisión, incertidumbre obtenida en el equipo Abbott Alinity el tamaño de la muestra, frecuencia de edad y género, e IR.

### 6.1 Precisión

Los cálculos se basaron en 20 valores obtenidos en el CCI con No. Lote 21929 del mes de agosto y los resultados se observan en la gráfica siguiente.

Gráfica 1. Resultados de precisión interserial de la MCHr en un nivel normal del CCI



Los estudios de precisión cumplen con el requisito de repetibilidad descritos en la ema, el criterio de aceptabilidad es que el % de CV tiene que ser menor al que proporciona el fabricante  $\leq 4.00$ . Todas las muestras cumplieron con los criterios de aceptación indicados.

## 6.2 Evaluación de la linealidad

En la table 6 se muestran los resultados de las  $\bar{x}$  obtenidas de la corrida por triplicado del CCI nivel bajo y alto con No. de Lote 22209, logrando un límite inferior de 27 pg. y un límite superior de 35.70 pg., dichos valores serán utilizadas para definir los límites de la recta. Las  $\bar{x}$  de la concentración de las 5 diluciones son utilizadas para el cálculo del porcentaje de error máximo permitido por el fabricante que es del  $\pm 8\%$  (tabla 7). La R2 obtenida de la recta fue del 0.9795 versus con la R2 esperada de 0.99 de acuerdo a la guía de la ema (gráfica 2).

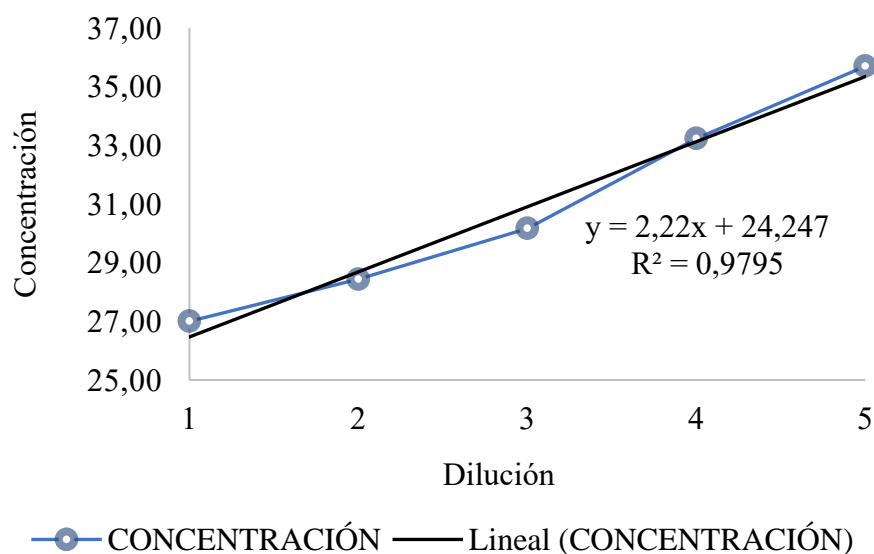
Tabla 6. *Resultados de la concentración media del MCHr por triplicado*

Número de dilución	Resultados de la concentración o de la actividad			$\bar{x}$
	1	2	3	
1	27	27.1	26.9	27.00
2	28.5	28.3	28.5	28.43
3	30.2	30.2	30.1	30.17
4	32.8	33.9	33	33.23
5	35.5	35.7	35.9	35.70

Tabla 7. % de error obtenido de la linealidad de los valores de MCHr

Número de dilución	$\bar{x}$ de los valores de concentración (Y)	Valor teórico (x)	Sesgo (desviación)	% Error Obtenido	Max. error de linealidad
1	27.00	27.00	0.00	0.00	
2	28.43	29.18	-0.74	-2.61	
3	30.17	31.35	-1.18	-3.91	±8
4	33.23	33.53	-0.29	-0.87	
5	35.70	35.70	0.00	0.00	

Gráfico 2. Linealidad de la concentración del MCHr



### 6.3 Veracidad

1. Los cálculos se basaron en 10 valores obtenidos del nivel normal del control interno con No. de Lote 22209 del mes de septiembre y los resultados se observan en la tabla siguiente, obteniendo un % de recuperación de 101.4 lo que indica que la recuperación es mayor a un 1.4% del mensurando y comparándolo con el resultado esperado al del fabricante fue menor, por lo que es aceptable para la verificación.

Tabla 8. *Cálculo de la veracidad mediante el % de recuperación*

No. Lectura	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$\bar{x}$	DE	%CV
MCHr (pg.)	29.2	29.1	29.2	29.0	28.8	29.1	28.8	29.2	29.0	28.9	29	0.18	0.61
Laboratorio	Valor obtenido										29	0.18	0.61
	% recuperación obtenida										101.4		
Grupo par	Valor esperado										28.6	0.79	2.78
	%Recuperación esperado										100±8		

2. El informe cronológico de los datos de laboratorio del MCHr durante los últimos 6 meses reportados en el PEA, están calculados por SDI. El promedio de los valores obtenidos fue menor a 1, de acuerdo con los criterios de la ema los resultados expresados en ISD no serán en promedio mayores a 1,0. Con esto se demuestra que se tiene un desempeño en comparación con otros laboratorios que cuentan con las mismas condiciones

Tabla 9. *Promedio histórico del ISD del APE de 6 meses, 2022.*

MES	CONTROL DE CALIDAD		
	BAJO	NORMAL	ALTO
Abril	0.60	0.61	-0.14
Mayo	0	0.06	-0.19
Junio	0.89	0.88	0.36
Julio	1.24	1.26	0.40
Agosto	0.72	0.99	0.71
Septiembre	1.23	1.32	0.70
Promedio	0.78	0.83	0.30

## 6.4 Incertidumbre

En la estimación de la incertidumbre se tomaron las concentraciones obtenidas de la corrida de 20 valores a partir del control normal con No. de Lote 22209 y se obtuvieron los siguientes resultados con las fórmulas descritas anteriormente (tabla.10). Como resultado se obtiene una incertidumbre expandida del  $\pm 0.400$  pg. con un nivel de confianza del 95%, lo que indica que el valor verdadero de la MCHr puede interpretarse como  $(29.0 \pm 0.400)$  pg. o en rangos; 28.600 a 29.400 pg.

TABLA 10. *Cálculo de la incertidumbre mediante una corrida intraserial del CCI normal*

Lectura	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
MCHr (pg.)	29.2	29.1	29.2	29.0	28.8	29.1	28.8	29.2	29.0	28.9	
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
	28.8	29.3	29.0	28.9	29.0	29.2	28.8	29.0	28.8	28.8	
Incertidumbre	Ur= 0.17		UB=0.11		Uexp= 0.400						

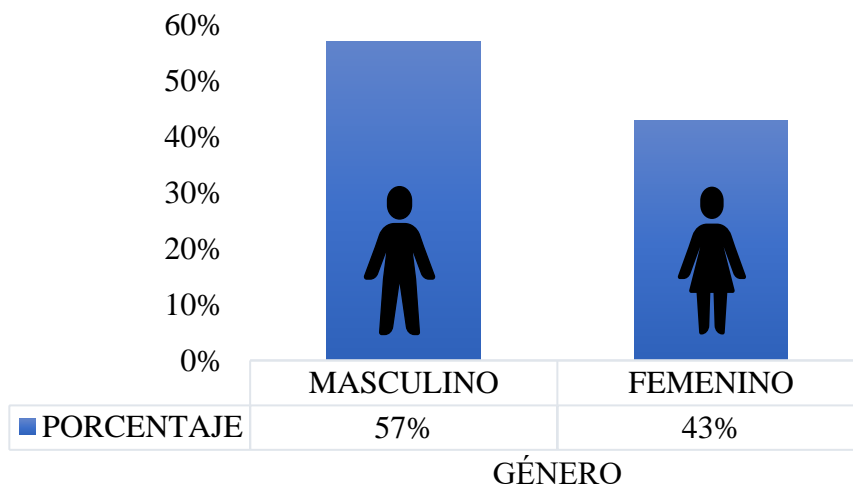
Resultado final  $\bar{x} \pm$  Incertidumbre Expandida =  $29.0 \pm 0.400$  pg.

## 6.5 Frecuencia del total de pacientes seleccionados

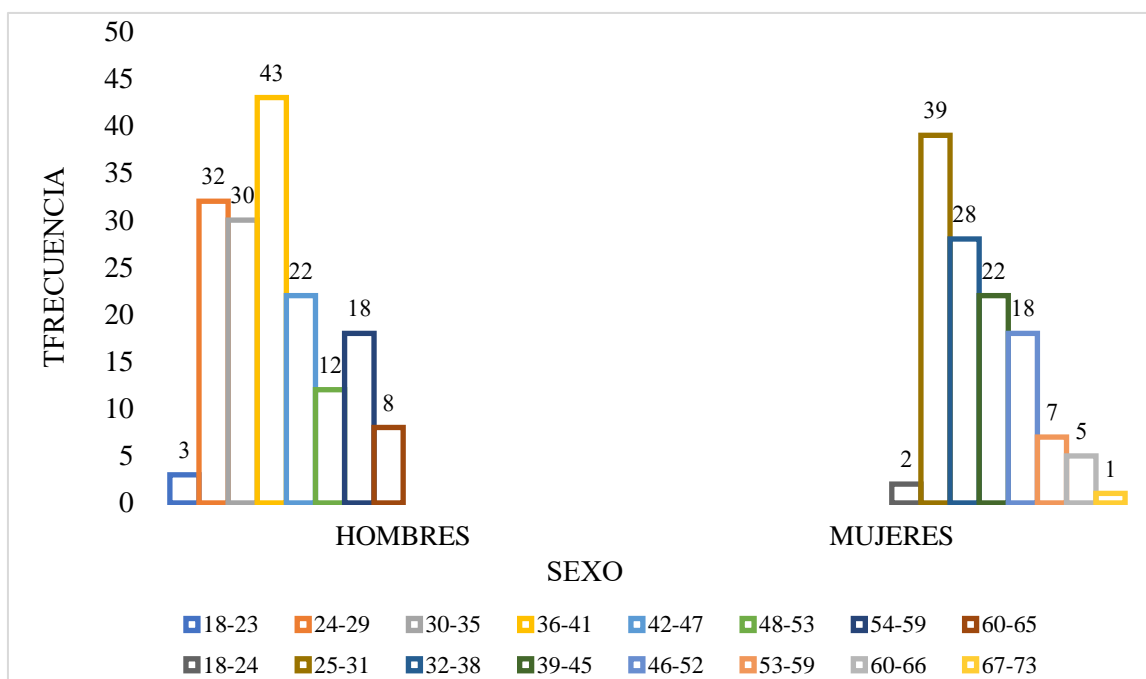
Se recolectaron 327 muestras de una población adulta, 186 fueron hombres que correspondían al 57% y 141 fueron mujeres que correspondían al 43% del resto de la población total en estudio (gráfica 2). Se observó tener una diferencia del 14% en pacientes hombres versus mujeres. La frecuencia por rango de edades en hombres y mujeres fue mayor entre los 25 y 31 años y en hombres entre 36 y 41 años (gráfico 3).

Del total de muestras de pacientes analizadas solo se seleccionaron 291 resultados ya que cumplieron con todos los criterios de aceptación ya mencionados.

Gráfica 2. Tasa de participación por género en el HU. UANL,2022



Gráfica 3. Frecuencia de edades en hombres y mujeres del HU-UANL,2022



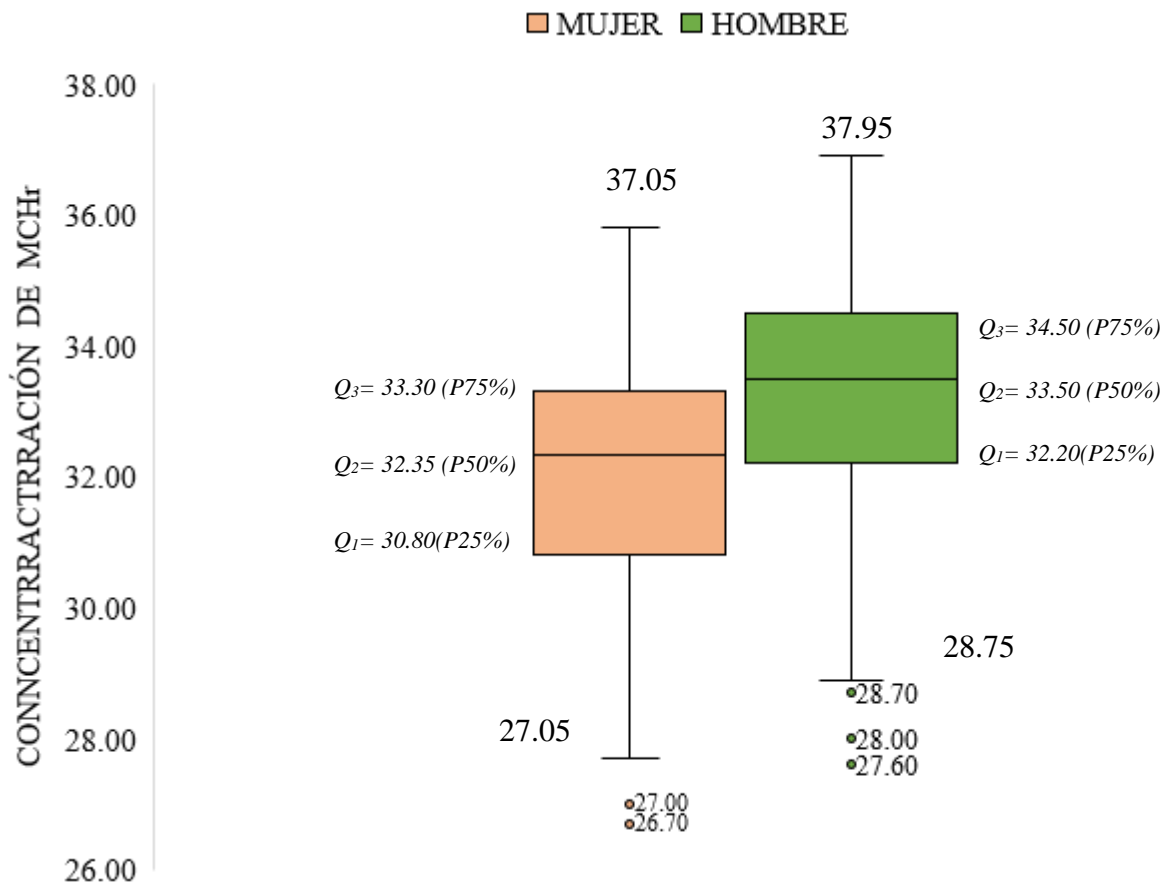
## 6.6 Cálculo de los IR

Para los IR se excluyeron los valores aberrantes mediante el método de tukey quedando 285 resultados para su cálculo. La cifra de los resultados de MCHr se establecieron en pg. tanto en hombres como en mujeres. Los resultados estadísticos obtenidos de los valores de la MCHr en mujeres fueron los siguientes:  $\bar{x}$  de 32.09 pg., una S de  $\pm 1.83$ , mediana de 32.35 pg., mientras que en hombres se obtuvo una  $\bar{x}$  de 33.28 pg., una S de  $\pm 1.74$  pg., una mediana de 33.500 pg. En la prueba de Tukey se rechazaron los valores por debajo y por encima de los valores inferiores y superiores que se obtuvieron del cálculo en hombres y mujeres, estos puntos aberrantes se pueden observar en la gráfica 4 respectivamente, al igual que se detallan los resultados de los valores intercuartiles en la tabla 11.

Tabla 11. *Cálculo del límite superior e inferior en hombres y mujeres*

	PERCENTIL (%)			Límite inferior	Límite superior
	25	50	75		
Hombres	32.20	33.50	34.50	28.75 pg.	37.95 pg.
Mujeres	30.80	32.35	33.30	27.05 pg.	37.05 pg.

Grafica 4. Distribución de los valores de la *concentración de la MCHr en hombres y mujeres*



Se establecen los valores de referencia para cada grupo tomando como el percentil 25% y 75%. Basándose en la gráfica 4 observamos que existe una ligera asimetría negativa en ambos grupos por el desplazamiento de los datos hacia la derecha, las medianas de ambos no son similares, pero se observó que en hombres presentó menos variabilidad de los datos que en las mujeres esto quiere decir que existe una mayor dispersión en sus valores. Una vez eliminado los valores aberrantes se determinaron los IR inferior y superior con la N total de valores en hombres y



mujeres y se establecieron los rangos de acuerdo con el valor que le correspondía del cálculo realizado como se observa en la tabla 12.

Tabla 12. *Determinación de los IR en hombres y mujeres,2022*

	<b>HOMBRES</b>	<b>MUJERES</b>
	$r_1 = 0.025 * n + 1$	$r_1 = 0.025 * n + 1$
Valor inferior	$r_1 = 0.025 * 165 + 1$	$r_1 = 0.025 * 120 + 1$
	$r_1 = 0.025 * 166$	$r_1 = 0.025 * 121$
	$r_1 = 4.15 \cong 4.0$	$r_1 = 3.02 \cong 3.0$
	$r_2 = 0.975 * n + 1$	$r_2 = 0.975 * n + 1$
Valor superior	$r_2 = 0.975 * 166$	$r_2 = 0.975 * 121$
	$R=161.85 \cong 162$	$R2=117.97 \cong 118$

En la tabla 13 se observa la validación de los IR transferibles que se obtuvieron una vez identificado el rango inferior y superior (tabla 12). Se observó que los valores de MCHr en hombres y mujeres cumplen con los criterios de la guía para su adaptación al laboratorio. Por lo que es aceptable para la población atendida de acuerdo con la guía CLSI EP28-A3, donde todos los valores obtenidos menor o mayor a estos valores se encontrarán fuera de los intervalos.

Tabla 13. Validación para la transferencia de los IR establecidos por el servicio de hematología del HU-UANL

Parámetros	IR(HU)	N° datos fuera del IR (%)	Establecer como IR
HCMr en Hombres	29.50-35.90	4 (2.42%)	SI
HCMr en Mujeres	28.10-35.70	2 (1.63%)	SI

### 6.5.1 Verificación de la hipótesis de la normalidad

Teniendo presente la hipótesis y los resultados obtenidos

H0: Los datos tanto en hombres como en mujeres provienen de una población significativamente normal

HA: Los datos tanto en hombres como en mujeres no provienen de una población significativamente normal.

Tabla 14. Prueba de normalidad en concentraciones de MCHr en mujeres y hombres

Variable	GI	Sig.	Decisión
MCHr Hombres	165	.001	Rechaza la hipótesis nula
MCHr Mujeres	120	.002	Rechaza la hipótesis nula

El valor p correspondiente en ambos grupos es significativamente menor a  $p > 0.05$ , lo que simboliza que tenemos evidencia para afirmar que los datos de nuestra variable se apartan significativamente de la normalidad y en consecuencia se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna de nuestra investigación en ambos grupos. Concluyendo que la prueba de normalidad de nuestra variable MCHr no presenta un comportamiento normal, se decide aplicar el estadístico Rho de Spearman.

### 6.5.2 Coeficiente de Correlación de Rangos de Spearman (Rho de Spearman) entre la MCHr-Hgb y VCM

Los resultados obtenidos en la tabla 15 y 16, muestra la correlación significativa entre la MCHr-Hb y VCM tomando como hipótesis lo siguiente por cada grupo

H0: No existe correlación entre las variables de MCHr-Hgb y VCM

H1: Existe correlación entre las variables de MCHr-Hgby VCM

#### Hombres

El p-valor calculado es de .002 y 000 que es menor a 0.01 en la correlación de MCHr -Hb y VCM por lo que rechazamos la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna, por consiguiente existe suficiente evidencia estadística para afirmar que la MCHr está relacionada significativamente con la Hb y VCM , por otra parte el coeficiente Rho de Spearman son : MCHr-Hbg=0.238 y MCHr-VCM=0.516, lo que indica que la relación entre la variable MCHr-Hbg es directa y su grado es media, mientras la MCHr-VCM es directa y moderada. Se puede afirmar con un 99% que existe una relación positiva entre el MCHr, Hgb y VCM

Tabla 15. *correlación de las variables MCHr-Hbg y MCHr VCM en hombres*

Correlaciones				
			Hbg	VCM
	MCHr	Coeficiente de	.238**	.516**
<b>Rho de</b>		correlación		
<b>Spearman</b>		Sig. (bilateral)	.002	.000
		N	169	169

\*\* . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

## Mujeres

El p-valor calculado es de .001 y 000 que es menor a 0.01 en la correlación de MCHr -Hbg y VCM por lo que rechazamos la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna, por consiguiente existe suficiente evidencia estadística para afirmar que la MCHr está relacionada significativamente con la Hb y VCM , por otra parte el coeficiente Rho de Spearman son : MCHr-Hb=0.294 y MCHr-VCM=0.416, lo que indica que la relación entre la variable MCHr-Hbg es directa y su grado es media, mientras la MCHr-VCM es directa y moderada. Se puede afirmar con un 99% que existe una relación positiva entre el MCHr, hemoglobina y VCM.

Tabla 16. *correlación de las variables MCHr-Hb y MCHr VCM en mujeres*

Correlaciones				
			Hbg	VCM
	MCHr	Coeficiente de correlación	.294**	.461**
<b>Rho de Spearman</b>		Sig. (bilateral)	.001	.000
		N	122	122

\*\* . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

## 7 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De acuerdo al criterio de las enmiendas para el mejoramiento de laboratorios clínicos (CLIA) se describe que para la precisión interserial la  $S$  debe ser de  $1/3$  o menor del ETp (Error total permitido)<sup>43</sup> esto quiere decir que para la MCHr el error total permitido es  $\pm 4\%$  de ahí comparar el %CV obtenido versus el criterio de aceptación, resulta que es menor por lo que la imprecisión del método de la MCHr por este método también es aceptable.

$$\sigma \text{ interserial} \leq 0,33 \text{ ETp}$$

$$0.78\% \leq 1.32\%$$

En la linealidad se aprecia que no se logró alcanzar un coeficiente de por lo menos del 0.99, en este aspecto nuestra recta no cumplió con lo sugerido por la ema, sin embargo, aunque estadísticamente no es lineal, clínicamente si llega a cumplirlo, y esto se fundamenta en que, si un procedimiento de medida resulte ser clínicamente lineal, el error de no linealidad no debe superar al 50% del requisito de la calidad seleccionado<sup>44</sup>. Entonces de acuerdo con las especificaciones de calidad nuestro porcentaje de error obtenido no supera el  $\pm 8\%$  del error esperado, por lo que, aunque nuestro resultado no es visualmente una recta, cumple con la linealidad del parámetro.

Para la veracidad del MCHr es complicado obtener materiales de referencia certificados por lo que se utilizó como valor esperado la media estipulada por los ensayos de aptitud interlaboratorios, el criterio de aceptabilidad fue calculada por el porcentaje de recuperación y también fue calculado por los estudios de comparación inter laboratorios con base en los resultados de los programas de ensayos de aptitud. La ema indica que al menos se demuestre la

consistencia en al menos los últimos 6 meses en la participación y en los resultados de PEA<sup>24</sup>. Se consideró 6 meses ya que el equipo tiene exactamente 6 meses de participación y también el requisito indispensable para acreditar el analito es que se pruebe en por lo menos dos de los tres niveles de decisión clínica del intervalo de medición del método, por lo que se decidió probar con los tres niveles de concentración.

En la propuesta de los IR para estimar el percentil 2,5 distinto del quinto percentil o el percentil 95 distinto del 97,5 (es decir  $P=2,5$ ) se requiere mínimo de 39 mediciones, la guía CLSI también refiere “no es necesario confiar enteramente en los extremos de un conjunto de valores observados a fin de obtener un intervalo de referencia no paramétrica de 95%. Estos pueden ser aberrantes o de lo contrario no representativos de los verdaderos valores del percentil de la población. De acuerdo a lo establecido en la guía de la CLSI EP28-A3C, para la aceptación de un intervalo de referencia debe cumplirse con al menos el 10% de los resultados de la prueba, entonces el laboratorio receptor puede adoptar los intervalos de referencia por lo que nuestros datos al analizar los resultados no sobrepasan más allá del 10 % fuera de los límites de referencia.

Aunque existan limitaciones inherentes a la hemoglobina reticulada, no deja de ser un crucial camino para que se establezca como biomarcador indispensable en el diagnóstico de anemia por deficiencia de hierro, ya que si no se establece la verificación adecuada puede llevar al médico a una mala decisión y perjudicar al paciente. Es por ello que la CLSI ha recomendado que todo laboratorio debe validar y verificar sus métodos de dicha prueba y establecer su propio intervalo de referencia adoptados para la población en estudio. Así que esta investigación se centró en la verificación y estandarización de los valores de referencia del a MCHr. La variabilidad

observada en los diferentes parámetros involucra la altitud de la población analizada, entre otras variables geográficas y raciales.

El paso complicado para determinar los IR es la recolección de muestras que cumplan con ciertas especificaciones ya descritas, en este protocolo para aumentar nuestra selección se utilizó sangre de donadores los cuales fueron evaluados por un médico especialista además de considerar que el servicio de transfusión de sangre del HU-UANL mantiene un estricto control de aceptación en sus pacientes durante la entrevista, junto con la encuesta validada por la guía CLSI C28, una institución de reconocimiento a nivel mundial y de mayor difusión entre las instituciones de laboratorio clínico<sup>45</sup>.

Cuando solo se disponía de hemogramas manuales la única forma de diagnosticar la anemia por deficiencia de hierro era esperar a que la hemoglobina disminuyera hasta el límite definido por la OMS. Hoy en día se hace apoyo y correlación con los índices eritrocitarios como lo son el VCM, MCHC y MCH (valores por debajo de 85 fL, 32% y 27 pg. respectivamente). La anemia ferropénica de acuerdo a la literatura cursa con una morfología en sus eritrocitos de microcitosis con hipocromía y un MCHr por debajo de 26 pg. Realizar la correlación entre la MCHr-VCM y Hgb es debido a que como se sabe la MCHr es un buen indicador para pacientes que estén cursando por un tipo de anemia ferropénica, se esperaría también que demuestre valores bajos al igual que con laHgb y VCM es por ello que se realizó el Rho de Spearman. Con los resultados obtenidos nos demuestra que estadísticamente si existe una correlación entre los parámetros descritos<sup>4</sup>.

## **8. CONCLUSIÓN**

Los resultados de este estudio han logrado verificar la MCHr en el equipo de Abbott-Alinity® equipo de VI generación y ayudado a determinar los VR en una población adulta del HU de la UANL, mostrando diferencias versus al del fabricante. Por lo que ha contribuido al conocimiento existente sobre la importancia de establecer los valores de referencia para cada población en particular. El inicio de esta investigación y la incorporación de este nuevo parámetro de la MCHr específicamente en el laboratorio del servicio de hematología contra el cáncer ha logrado despertar valiosas investigaciones pro al diagnóstico de varias enfermedades en pacientes que asisten día con día en el departamento en particular en la deficiencia de hierro lo que antes se disponía de hemogramas manuales o estudios caros. Las limitaciones más importantes en general sobre la verificación de métodos clínicos y determinar los VR, son en costos y tiempo. Es por ello que hoy en día dificultamos este uso del parámetro MCHr como prueba diagnóstica ya que solo se encuentran en laboratorios de 3 nivel que cuenta con hemogramas de VI generación., sin embargo aun así , la insistencia de verificar el método y establecer los propios IR y el compromiso que tienen algunos laboratorios de trabajar con altos estándares de gestión de la calidad y con los lineamientos que las normas de laboratorio exigen, es posible que el servicio de hematología del HU cuente con la acreditación del cumplimiento de la Norma ISO 15189:2022 para la acreditación en los laboratorio, es de saber que es un gran reto para los laboratorios en México ya que así se demuestra la competencia y el desempeño clínico. Se demuestra que los procedimientos de medida analítica del desempeño estipulado por el fabricante cumplen con los requisitos de calidad de laboratorio con el proyecto de verificación del autoanalizador Alinity hq. guías y normas como la ema, CLSI, la NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos e ISO 15189:2012,



fundamentan el desarrollo del protocolo de verificación del método y el desempeño de acuerdo a las especificaciones del fabricante a un costo razonable. Además de asegurar que el equipo mantiene su aprobación de calidad ya que participa en los programas de garantía externa de la calidad para laboratorios clínicos por Qualitat® y un programa de evaluación interlaboratorios mensual por Streck, STATS ®.

La guía CLSI establece los criterios basados en referencias bibliográficas de expertos, a través de consensos de grupos especializados y en sus trabajos han sido utilizado diversos estudios, así este estudio realizado en Monterrey Nuevo León del HU en adultos sanos, podría formar parte de un gran avance en la investigación clínica.

## 9.BIBLIOGRAFÍA

1. ISO 15189:2012 demands for method verification and validation. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 58(3), 361–367. <https://doi.org/10.1515/cclm-2019-1053>
2. NMX-EC-15189-IMNC-2015
3. NMX-CH-152-IMNC-2005. *Metrología en Química-Vocabulario*.
4. Campuzano-Maya, G., & Guevara-Arismendy, N. M. (2015). Hemoglobina reticulocitaria: un nuevo parámetro del hemograma de gran valor en el diagnóstico y manejo de la eritropoyesis deficiente en hierro. *Medicina y Laboratorio*, 21(1–2), 11–42. <https://doi.org/10.36384/01232576.107>.
5. Alonso, M. (s/f). Contenido de Hemoglobina de Reticulocitos (CHR). *Hematología*. 2013 enero-marzo. Fracción inmadura de reticulocitos (FIR), 17, 67–69.
6. Reyes, H., Laser, H., Sarraff, F., Teresa, A., & Andrade Ruiseco, M. (2015). El conteo automático de reticulocitos: una herramienta de uso diagnóstico, clínico e investigativo. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 4.
7. Maydana L. Utilidad de los parámetros del contador hematológico en el diagnóstico de anemias: marcadores bioquímicos clásicos. En: nuevos marcadores bioquímicos en equipos de última generación para el estudio de pacientes con anemia. XXIII Congreso Argentino de Hematología. Argentina; noviembre 2017.p. 120-125
8. Sáez, P. O. (2010). Recomendaciones para el estudio de la cooximetría. *Documentos de la SEQC*.
9. Piva, E., Brugnara, C., Spolaore, F., & Plebani, M. (2015). Clinical utility of reticulocyte parameters. *Clinics in Laboratory Medicine*, 35(1), 133–163. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2014.10.004>

10. Campuzano-Maya, G., Buttarello, M., Temporin, V., Ceravolo, R., Farina, G., & Bulian, P. (2007). Del hemograma manual al hemograma de cuarta generación. The new reticulocyte parameter, 133, 511–550.
11. Buttarello, M., Temporin, V., Ceravolo, R., Farina, G., & Bulian, P. (2004). The new reticulocyte parameter (RET-Y) of the Sysmex XE 2100: its use in the diagnosis and monitoring of posttreatment sideropenic anemia. *American Journal of Clinical Pathology*, 121(4), 489–495. <https://doi.org/10.1309/W652-95DT-UWK7-U1HH>
12. Torino AB, Gilberti Mde F, da Costa E, de Lima GA, Grotto HZ. Evaluation of red cell and reticulocyte parameters as indicative of iron deficiency in patients with anemia of chronic disease. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2014; 36: 424-429
13. Guevara-Arismendy NM, Tangarife-Castaño VJ. Fase preanalítica: punto crítico en las pruebas de diagnóstico hematológico. *Medicina & Laboratorio* 2016; 22: 411-446.
14. Brugnara C, Schiller B, Moran J. Reticulocyte hemoglobin equivalent (Ret He) and assessment of iron-deficient states. *Clin Lab Haematol* 2006; 28: 303-308
15. Fishbane S, Galgano C, Langley-Jr RC, Canfield W, Maesaka JK. Reticulocyte hemoglobin content in the evaluation of iron status of hemodialysis patients. *Kidney international*. 1997;52(1):217-22
16. Mast AE, Blinder MA, Dietzen DJ. Reticulocyte hemoglobin content. *American Journal of Hematology*.2008;83(4):307-310
17. Márquez-Benítez Y, Cruz-Rubio S, Vargas D. Hemoglobina de reticulocito y su importancia en el diagnóstico temprano de anemia ferropénica. *Univ. Salud*. 2018;20(3):292-303. DOI: <http://dx.doi.org/10.22267/rus.182003.133>
18. Evan M. Braunstein, MD, PhD, Johns Hopkins University School of Medicine

19. Essing the iron status of populations: report of a joint World Health Organization/ Centers for Disease Control and Prevention technical consultation on the assessment of iron status at the population level, 2nd ed., Geneva, World Health Organization, 2007.
20. Interpretación clínica del hemograma. Dra. Mónica Torrens P. Hematólogo. Rev. Med.Clin. Condes-2015,26(6) 713-725.
21. Assessing the iron status of populations: report of a joint World Health Organization/ Centers for Disease Control and Prevention technical consultation on the assessment of iron status at the population level, 2nd ed., Geneva, World Health Organization, 2007.
22. Hemoglobina de reticulocitos y su importancia en el diagnóstico temprano de anemia ferropénica, Revista Bioanálisis I junio 2019 l 15 años juntos.
23. Manual de operaciones Alinity h-series G5-6898R04. 2019-09-03
24. Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico. Entidad Mexicana de Acreditación (ema), Centro Nacional de Metrología (CENAM). México, junio de 2017.
25. Theodorsson E. Validation and verification of measurements methods in clinical chemistry. Bioanalysis. 4:305-320, 2012
26. NMX-CH-5725-1-IMNC-2006. Exactitud (veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición, parte 1: Principios generales y definiciones. 1ª. Edición, 2006
27. NMX-EC-15189-IMNC-EC-2015/ISO 15189:2022
28. Sunderman F. Current Concepts od “Normal Values,” “Reference Values” and “Discrimination Values” in Clinical Chemistry. Clin Chem. 1975; 21(13).
29. Grasbeck, R., and Saris, N. E., Establishment and use of normal values. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1969;24, Suppl. 110: 62.

30. International Federation of Clinical Chemistry. Provisional recommendation on the theory of reference values (1978). *Clin Chem.* 1979;25(8):1506-1508.
31. Taylor, W. F., Reference intervals, nonparametric methods. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 29 (Suppl. 126), 19.12 (1972).
32. Mengolé, P. (2018). Determinación de intervalos de referencia de hemoglobina y hematocrito en una población de estudiantes de entre 18 y 25 años de ambos sexos de lima, de acuerdo al método no paramétrico recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), GUÍA C28-A3.
33. Organización Mundial De La, S. (2014). Documentos básicos. organización mundial de la Salud.
34. Ceriotti F. Reference intervals: the way forward. *Ann Clin Biochem* 2009; 46:8-17.
35. CLSI. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory: Approved guideline. 3rd Edition. CLSI document C28-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008
36. Westgard O. James. *Basic Method Validation*. 2nd. Edition. 2003 pp.29-30,87-99, 111-122
37. ISO/IEC 17025:2017. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración/ NMX-EC-17025- IMNC-2017
38. NMX-CH-140-INMC-2002. Guía para la expresión de incertidumbre en las mediciones.
39. Martínez-González MA, Ruiz-Canela M, Guillén-Grima F. Estimación del tamaño muestral. En: Martínez-Sánchez MA, Sánchez-Villegas A, Toledo EA, Faulin J, eds. *Bioestadística amigable*, 3ª ed. Elsevier España, SL. Madrid, 2014; 201-12. (HTML).
40. Ibáñez-Alcalde, M. M., Vázquez-López, M. Á., Ruíz-Sánchez, A. M., Lendínez-Molinos, F. J., Galera-Martínez, R., Bonillo-Perales, A., & Parrón-Carreño, T. (2018). Reference

- values of reticulocyte hemoglobin content in healthy adolescents. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 40(4), 298-303.
41. Díaz PP, Olay FG, Hernández GR, et al. Determinación de los intervalos de referencia de biometría hemática en población mexicana. *Rev Mex Patol Clin Med Lab*. 2012;59(4):243-250.
  42. User verification of performance for precision and trueness EP15-A2; approved guideline – second edition. (2005). CLSI Wayne, PA, USA: CLSI; 2005
  43. Mayorga, L.A(2022), *Manual de Metodología de la investigación*.
  44. Westgard, O. (2003). *Basic Method Validation*. 111–122.
  45. Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos.

## 10. ANEXOS

### CONSENTIMIENTO TOMA DE MUESTRA PROTOCOLO DE VALIDACIÓN

**FECHA:**

**NOMBRE Y APELLIDO:**

**FECHA DE NACIMIENTO:**

**EDAD:**

**SEXO: F M**

**OCUPACIÓN:**

**LUGAR DE RESIDENCIA:**

- Toma algún tipo de medicamento como anticoagulante, antibiótico o algún otro tipo (especificar) \_\_\_\_\_
- Esta bajo algún tipo de tratamiento como quimioterapia, o algún otro que dependa su salud: si  no  Cuál? \_\_\_\_\_
- Ingiere alcohol: si  no  ocasional
- Es fumador: si  no  ocasional
- ¿Padece algún tipo de enfermedad como hipertensión arterial, diabetes mellitus, artritis reumatoide, enfermedad cardiovascular, respiratoria, enfermedad renal, hematológica (anemia), u otra? si  no  Cuál? \_\_\_\_\_
- Ha recibido algún tipo de transfusión sanguínea o realizado alguna donación de sangre en los últimos 3 meses. si  no  Cuando? \_\_\_\_\_
- Tiene antecedentes de enfermedad tumoral, hematológica o autoinmune.  
si no  Cuál? \_\_\_\_\_

## CARTA APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA E INVESTIGACIÓN



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

**DR. DAVID GÓMEZ ALMAGUER**

Investigador principal  
Servicio de Hematología  
Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González"  
Presente.-

Estimado Dr. Gómez:

En respuesta a su solicitud con número de ingreso **PI22-00226** con fecha del **02 de agosto del 2022**, recibida en las oficinas de la Secretaría de Investigación Clínica de la Subdirección de Investigación, se extiende la siguiente notificación con fundamento en el artículo 41 BIS de la Ley General de Salud; los artículos 14 inciso VII, 99 inciso II, 102, 111 y 112 del Decreto que modifica a la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la salud publicado el día 2 de abril del 2014; además de lo establecido en los puntos 4.4, 6.2, 6.3.2.8, 8 y 9 de la Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012, que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos; así como por el Reglamento interno de Investigación de nuestra Institución.

Se le informa que el Comité a mi cargo ha determinado que su proyecto de investigación clínica abajo mencionado cumple con la calidad técnica y el mérito científico para garantizar la correcta conducción que la sociedad mexicana demanda, por lo cual ha sido **APROBADO**.

Titulado "**Validación de parámetros nuevos en la citometría hemática en población sana**".

De igual forma el (los) siguiente(s) documento(s):

NOMBRE DEL DOCUMENTO	VERSIÓN	FECHA
Protocolo	2	25 de Agosto del 2022

Por lo tanto usted ha sido **autorizado** para realizar dicho estudio en el **Servicio de Hematología** del Hospital Universitario como Investigador Responsable. Su proyecto aprobado ha sido registrado con la clave **HE22-00027** La vigencia de aprobación de este proyecto es al día **06 de septiembre del 2023**.

Participando además la Dra. Yadhith Karina López García como **tesista**, el Dr. Andrés Gómez de León, Dra. Perla Rocío Colunga Pedraza, M.C. María del Rosario Salazar Rojas y el Est. José Emiliano Montelongo Cepeda como co-investigadores.

Toda vez que el protocolo original, así como la carta de consentimiento informado o cualquier documento involucrado en el proyecto sufran modificaciones, éstas deberán someterse para su re-aprobación.

Toda revisión será sujeta a los lineamientos de las Buenas Prácticas Clínicas en Investigación, la Ley General de Salud, el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud, la NOM-012-SSA3-2012, el Reglamento Interno de Investigación de nuestra Institución, así como las demás regulaciones aplicables.

### Comité de Investigación

Av. Francisco I. Madero y Av. Gonzalitos s/n, Col. Mitras Centro, C.P. 64460, Monterrey, N.L. México  
Teléfonos: 818329 4050, Ext. 2870 a 2874. Correo Electrónico: investigacionclinica@meduanl.com







UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

El seguimiento continuo al estudio aprobado será el siguiente:

1. Al menos una vez al año, en base a su naturaleza de investigación.
2. Cuando cualquier enmienda pudiera o claramente afecte bienestar y los derechos de los sujetos de investigación o en la conducción del estudio.
3. Cualquier evento o nueva información que pueda afectar la proporción de beneficio/riesgo del estudio.
4. Así mismo llevaremos a cabo auditorias por parte de la Coordinación de Control de Calidad en Investigación aleatoriamente o cuando el Comité lo solicite
5. Será nuestra obligación realizar visitas de seguimiento a su sitio de investigación para que todo lo anterior se encuentre debidamente consignado. En caso de no apegarse, este Comité tiene la autoridad de suspender temporal o definitivamente la investigación en curso, todo esto con la finalidad de resguardar el bienestar y seguridad de los sujetos en investigación



Atentamente,  
"Aera Flammam Veritalis"

Monterrey, Nuevo León, a 06 de septiembre del 2022

COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN  
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

DR. med. OSCAR DE LA GARZA CASTRO  
Presidente del Comité de Ética en Investigación

**Comité de Ética en Investigación**

Av. Francisco I. Madero y Av. Gonzalitos s/n, Col. Mitras Centro, C.P. 64460, Monterrey, N.L. México  
Teléfonos: 81 8329 4050, Ext. 2870 a 2874. Correo Electrónico: investigacionclinica@meduam.com



September 18, 2017