

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA



COMPARACION ANALITICA DE DOS MARGAS DE REACTIVOS
PARA QUIMICA CLINICA

Informe de tesis

Presentado por

Julia Isabel Alvarado Egli

Para optar al título de

Química Bióloga

Guatemala, enero de 2006.

DL
06
F(2410)

MIEMBROS DE JUNTA DIRECTIVA

M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán	Decano
Licda. Jannette Sandoval Madrid de Cardona	Secretaria
Licda. Gloria Elizabeth Navas Escobedo	Vocal I
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal II
Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez	Vocal III
Br. Juan Francisco Carrascoza Mayén	Vocal IV
Br. Susana Elizabeth Aguilar Castro	Vocal V

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a Dios y a la Virgen María, que siempre han estado presentes en mi vida y me han dado muchas bendiciones.

A mis padres, Dr. Carlos Alberto Alvarado Dumas y Licda. Julia del Carmen Egli Prieto de Alvarado por su ejemplo, sacrificios, confianza, apoyo y el amor que me brindaron siempre.

A mis hermanas y hermanos, Karla Maria Alvarado Egli de Ramírez, Carmen Elizabeth Alvarado Egli de Boles, Carlos Alberto Alvarado Egli, Andrés Alejandro Alvarado Egli, que siempre han hecho mi vida muy feliz.

A mi hija Sofía Isabel Estrada Alvarado, porque todos los días me enseña la alegría de vivir.

A Luis Fernando Ramírez, Robert Boles, Nancy Hernández de Alvarado por su amistad y cariño.

A mis tíos, Marco Antonio Ovando y Beatriz Alvarado de Ovando, por su cariño y consejos.

A mis amigas y amigos de siempre, Carolina Guzmán de Meléndez, Evelyn Rubio, Claudia Sigui de Domínguez, Ana Luisa Cotton de Boburg, Any Vettorazzi de Taracena, Rabindranath Valdes, por todos los momentos que compartimos cuando estudiamos en la Facultad, por la amistad y cariño que les tengo.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora, Licenciada Alba Marina Valdés de García, por el apoyo, asesoría y amistad que me ha brindado siempre.

Al Licenciado Rafael Armando Elgueta Spinola, por la paciencia, los consejos, el apoyo científico y amistad que me ha dado.

A mis revisores, Licenciada Margarita de Ramírez y Licenciada Kenia Caballeros por el tiempo que dedicaron a este trabajo de tesis.

A Merck S.A., por facilitarme el uso del equipo y los reactivos necesarios para el desarrollo de este estudio.

Al Laboratorio Clínico del IGGS zona 9, Laboratorio Clínico de Unidad Nacional de Atención al Enfermo Renal Crónico (UNAERC) y el Laboratorio Clínico de APROFAM, por las muestras de sueros de pacientes aportados para realizar este proyecto.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, que me abrió las puertas para prepararme profesionalmente.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, por todos los conocimientos que enriquecieron mi saber.

INDICE

	Página
I. Resumen	7
II. Introducción	9
III. Antecedentes	11
A. Procedimientos de trabajo	11
1. Fase pre-analítica	11
2. Fase analítica	11
3. Fase post-analítica	11
B. Clasificación de los métodos de medición	12
1. Método definitivo o de alta precisión	12
2. Método de referencia	12
3. Métodos de campo	13
C. Propósito de la evaluación de métodos	13
1. Requerimientos para el laboratorio	13
2. Requerimientos para el fabricante	14
3. Requerimientos médicos	15
D. Requerimientos para la selección de métodos en el Laboratorio	15
1. Evaluación de necesidad	16
2. Características de aplicación	16
3. Características de rendimiento analítico	17
E. Evaluación de un método en el Laboratorio	19
1. Familiarización	19
2. Estabilidad	19
3. Linealidad	19
F. Experimentos de evaluación final	19

1. Comparación de métodos	20
G. Técnicas espectrales	21
1. Espectrofotómetro de haz simple	21
H. Automatización en análisis clínicos	22
IV. Justificación	24
V. Objetivos	25
VI. Hipótesis	26
VII. Materiales y métodos	27
A. Universo	27
1. Muestra	27
B. Materiales	27
C. Método	29
1. Identificación de las metodologías de trabajo de los reactivos usados	29
2. Recolección de muestras	29
3. Principios de los reactivos de diagnóstico Merck®	29
4. Principios de los reactivos de diagnóstico DCL®	33
5. Procesamiento automatizado de muestras	38
a) Equipo automatizado Merck® Vitalab Selectra 2	38
6. Diseño de la investigación	41
7. Análisis de resultados	42
VIII. Resultados	43
IX. Discusión de Resultados	49
X. Conclusiones	51
XI. Recomendaciones	52
XII. Referencias Bibliográficas	53
XIII. Anexos	55

I. RESUMEN

El área de Química Clínica es una de las más desarrolladas por los laboratorios clínicos, ya que en ella se analizan electrolitos, enzimas, gases y sustratos del organismo, los cuales revelan el mecanismo bioquímico del cuerpo humano, del que depende gran parte de las enfermedades que afectan al individuo. Para este propósito, muchas industrias fabrican reactivos químicos, cuya calidad está respaldada por su alto nivel tecnológico y por el profundo nivel de investigación que realizan antes de ponerlos a disposición de los laboratorios clínicos, satisfaciendo en todos los casos los requerimientos de las Normas ISO 9001.

La buena calidad de los reactivos influye en el costo de los mismos, por lo que los reactivos "baratos" pueden tener problemas de calidad o desempeño. Por lo anterior, los laboratorios clínicos deben analizar cuidadosamente los reactivos que pueden ser utilizados en el análisis de muestras de pacientes, a fin de darles un resultado confiable que refleje su verdadero estado de salud. Para ello es necesario utilizar insumos de alta calidad, sin elevar por ello el costo de dichas pruebas y el precio que deben cobrar a sus pacientes.

Para los propósitos de esta tesis, se hizo un estudio de comparación de resultados obtenidos en 10 analitos, procesando las muestras obtenidas con dos reactivos químicos. Las marcas comerciales usadas en este estudio fueron Merck® de Alemania, utilizada como "método de comparación" para el estudio y la otra marca comercial fue Diagnostic Chemical Limited (DCL®) de Canadá, utilizada como "método a comparar". Ambas marcas indican en los insertos de cada analito, los estudios que realizaron para garantizar la exactitud y precisión de sus productos.

Los 10 analitos realizados para efectuar la comparación mencionada fueron: bilirrubina directa, bilirrubina total, colesterol total, creatinina, glucosa, nitrógeno de urea, triglicéridos, transaminasa glutámico oxalacética, transaminasa glutámico pirúvica y fosfatasa alcalina. Las reacciones de los métodos utilizados son colorimétricas o enzimáticas, dependiendo del analito o prueba realizada.

Las muestras se procesaron en un analizador automatizado, Merck® Vitalab Selectra 2, para evitar posibles errores humanos; los resultados fueron analizados utilizando las siguientes pruebas estadísticas: el promedio, la desviación estándar, la prueba de "t", la probabilidad prueba de "p" y el coeficiente de correlación de concordancia.

Según los análisis estadísticos, se puede concluir que no existe diferencia estadísticamente significativa entre el método de comparación Merck y el método a comparar DCL®, con los reactivos de: bilirrubina directa, bilirrubina total, nitrógeno de urea, transaminasa glutámico oxalacética y transaminasa glutámico pirúvica.

El análisis para las pruebas del colesterol total, glucosa, creatinina, triglicéridos y fosfatasa alcalina, demuestra que los resultados obtenidos utilizando reactivos de los métodos de Merck® y los de DCL®, son diferentes significativamente.

Se observó como una constante que las muestras que estaban dentro de los rangos con valores normales tenían resultados similares entre si con mínima diferencia; mientras que en las muestras con valores patológicos, se observó una mayor variación y dispersión entre los datos.

II. INTRODUCCION

En Guatemala existen muchos laboratorios clínicos que atienden las necesidades de la población. Sin embargo, para ser confiables dichos laboratorios necesitan de la alta calidad profesional de las personas que realizan el trabajo, del equipo adecuado y de la calidad y confiabilidad de los insumos con los que se procesan las muestras. Todos estos aspectos deben considerarse como de la mayor importancia para asegurar la confiabilidad de los resultados a un costo razonable para el laboratorio y a un precio accesible y competitivo para el paciente.

Constantemente, muchas casas comerciales desarrollan nuevos métodos de diagnóstico clínico, con el fin de mejorar la exactitud y la precisión de los ya existentes, para reducir el costo de reactivos y de la mano de obra a través de la automatización. La calidad de los reactivos de diagnóstico se asegura a través de la certificación que los fabricantes obtienen al cumplir con los requisitos de las Normas ISO 9001 (International Standard Organization).

Es indispensable que cada laboratorio evalúe los métodos que utiliza según sus necesidades, las cuales dependen de varios elementos, tales como el equipo que posee, el volumen de las muestras que utiliza (ejemplo: en aplicaciones pediátricas), el tiempo de procesamiento de las muestras, los tipos de muestra, el control de calidad, el espacio requerido, la estabilidad de los reactivos y el costo de cada prueba, que es un aspecto de mucha importancia, tanto para el laboratorio como para el paciente (1 - 6).

Las razones que crean la necesidad de cambiar los métodos de diagnóstico para química clínica en el laboratorio son: la variación en los costos de reactivos, la adquisición de un nuevo equipo y los avances en la tecnología (1).

La literatura proporcionada por cada fabricante en sus reactivos permite conocer la precisión y la exactitud del método de diagnóstico, pero es importante verificarlo en la práctica. Para lograrlo, es necesario procesar un número significativo de muestras, cuyos resultados se analizan por medio de fórmulas estadísticas. Este proceso no es una rutina de control de calidad, en la que se detectan los errores analíticos del método en uso. El control de calidad de rutina

detecta errores sólo cuando éstos exceden el error inherente del método, es decir, cuando el rendimiento del método se ha deteriorado. Se requiere experimentos de evaluación de métodos para examinar los errores analíticos inherentes de un método y relacionarlos con los requerimientos médicos (1).

Al seleccionar un nuevo método de diagnóstico para química clínica, ya sea por la utilización de nueva tecnología, por la adquisición de nuevo equipo o por la variación en el costo de los reactivos, se debe analizar: la información que proporciona el fabricante, la experiencia de otros colegas al utilizar los métodos nuevos y, lo más importante, los resultados que se obtenga al comparar el nuevo método con el método conocido y entonces aceptarlo si cumple con los requerimientos más importantes, tales como precisión, exactitud, reproducibilidad y costos razonables sin perder la calidad (1 - 4).

Todo el personal del laboratorio que lleva a cabo o que participa en la introducción de un nuevo método, debe estar familiarizado con todos los detalles y todas las instrucciones de operación de los métodos de reactivos a comparar antes de recolectar cualquier dato que pueda ser usado para caracterizar el proceso (1, 5).

En este trabajo de tesis se comparo con diferentes pruebas estadísticas, la capacidad analítica entre dos métodos de diagnóstico para química clínica: Merck® que es una marca reconocida internacionalmente y con muchos años de experiencia, que se uso como método de comparación, y la marca DCL®, como el método a comparar. Ambos fabricantes certifican sus productos a través de las Normas ISO 9001.

Las muestras se procesaron en el equipo automatizado Merck Vitalab Selectra 2 y se analizaron sustratos y enzimas, entre ellos: bilirrubina directa, bilirrubina total, colesterol total, creatinina, glucosa, triglicéridos, nitrógeno de urea, transaminasa glutámico oxalacética (ASAT), transaminasa glutámico pirúvica (ALAT) y fosfatasa alcalina.

III. ANTECEDENTES

A. Procedimientos de trabajo:

Con el propósito de describir el entorno en el que se desarrolló este trabajo de investigación, conviene recordar que en un laboratorio clínico se desarrolla una serie completa de labores, las que pueden ser clasificadas en diferentes fases o etapas que se desarrollan en orden de secuencia. Dichas fases pueden ser descritas de la manera siguiente:

1. Fase pre-analítica:

En esta primera etapa se encuentran las indicaciones que el paciente debe recibir para realizar el análisis solicitado por el médico. La toma y manejo adecuado de muestras según la solicitud de exámenes, almacenamiento y transporte de las muestras si fuera necesario (2).

2. Fase analítica:

En la fase analítica se realizan las mediciones y observaciones de las diversas áreas que cubre el laboratorio. Cada procedimiento de análisis debe describir no solo las mediciones y observaciones implementadas en el laboratorio, sino también la verificación de las características de ejecución que pretende el autor del procedimiento o el fabricante del sistema analítico. Además, debe incluirse los procedimientos de control que corresponden a cada medición y observación, incluyendo los aspectos de control interno y evaluación externa de la calidad de las pruebas realizadas o de los reactivos y materiales utilizados (2). El presente trabajo de tesis se realiza dentro de esta fase.

3. Fase post-analítica

En esta etapa se estudia los resultados obtenidos, los que se correlacionan con las sintomatologías del paciente, lo cual permite elaborar un informe real del problema que presenta, a fin de que éste pueda ser resuelto (2).

B. Clasificación de los métodos de medición:

Como se sabe, un método de medición es el conjunto de procedimientos que se utilizan para medir y así obtener un resultado. Para los propósitos del análisis realizado en este trabajo de investigación, es conveniente clasificar dichos métodos de medición, a fin de realizar las observaciones y mediciones indicadas, con instrumentos, reactivos, calibradores y materiales de control adquiridos comercialmente, listos para usarse, o bien, preparados en el laboratorio (1, 2).

Atendiendo los criterios básicos, los métodos de medición pueden ser clasificados en los grupos siguientes:

1. Método Definitivo o de alta precisión:

Son los métodos que tienen un margen de error sistemático muy bajo y son de alta precisión. Normalmente, se basan en la dilución de isótopos (cromatografía y espectrometría de masas). Este método se utiliza para analizar materiales primarios y de referencia. Por lo general están fuera del alcance de los laboratorios clínicos, ya que requieren de instrumentos extremadamente complejos. Algunos laboratorios especializados usan estos métodos para asignar concentraciones de analito en suero humano. Si ese material es el mejor estándar de medición disponible, puede considerarse material de referencia primario. Este método también se utiliza para validar la precisión de los métodos de referencia (2).

2. Método de referencia:

Son métodos cuidadosamente investigados que también tienen un margen de error sistemático muy bajo y son de alta precisión. Se utilizan para analizar materiales de referencia secundarios. Están disponibles en algunos laboratorios, sin embargo, la cantidad de pasos y operaciones necesarias para ser utilizados, los hacen inoperantes para un trabajo rutinario. Se usan con el propósito de asignar valores a materiales de referencia secundarios y validar así la exactitud de métodos de campo (1, 2).

3. Métodos de campo:

Estos métodos son utilizados para mediciones de química clínica de rutina con kits comerciales o reactivos preparados en el laboratorio. Se utilizan para obtener resultados en forma inmediata y con el mismo grado de confiabilidad, según lo indicado por los proveedores de dichos reactivos. Son métodos usados diariamente en el laboratorio. No obstante que estos métodos de campo deben cumplir, simultáneamente, las condiciones de ser veraces y precisos para apoyar el diagnóstico correcto, deben ser sencillos, resistentes y rentables (2).

En esta clasificación de métodos y materiales de referencia se observa claramente cómo se transfiere la exactitud de los métodos de mayor precisión a los métodos rutinarios que se calibran con materiales secundarios, con materiales de referencia o hasta con la utilización de un estándar de trabajo. De esta manera, la calibración aplicada a las mediciones de muestras de pacientes se validan indirectamente por métodos definitivos (2).

Durante los últimos 15 años se ha implementado técnicas para mejorar los estándares de calidad de los métodos analíticos cuantitativos utilizados en los laboratorios clínicos de Guatemala, incrementando la confiabilidad y reproducibilidad de los mismos, logrando así, al mismo tiempo, que el trabajo sea más rápido, de alta calidad y a un costo más bajo. El énfasis del profesional se ha desplazado hacia la selección y evaluación del método de reactivo que mejor se adapte a la situación del laboratorio. Se ha reconocido que el rendimiento de un método puede ser considerado objetivamente como aceptable, sólo si sus errores son suficientemente pequeños como para ser aceptados para uso médico (1 - 4).

C. Propósito de la evaluación de métodos

1. Requerimientos para el Laboratorio:

Habitualmente, los nuevos métodos analíticos se desarrollan para mejorar la exactitud y la precisión de los ya existentes. De la misma manera, para su

automatización, para reducir el costo de los reactivos y de la mano de obra, o para la determinación de una nueva variable analítica.

El proceso de evaluar un método es diferente al proceso de rutina de control de calidad de un método, una vez que ha sido introducido para su uso diario. El control de calidad de rutina (diario) es el proceso mediante el cual el aumento del tamaño y de la frecuencia de los errores analíticos de un método son detectados, a fin de que éste pueda ser reparado. El control de calidad de rutina detecta errores sólo cuando éstos exceden el error inherente al método cuando se establecieron los intervalos de control. El control de calidad de rutina no es capaz de determinar la magnitud de los errores inherentes del método o decidir si son aceptables (1, 3, 4).

2. Requerimientos para el fabricante:

Cuando un fabricante desarrolla un nuevo método y lo prepara para lanzarlo al mercado, la FDA (Food and Drug Administration) le requiere que indique el rendimiento analítico del método, específicamente en cuanto a precisión y a exactitud. Los compradores potenciales, al seleccionar métodos, comparan a menudo las indicaciones de diferentes fabricantes, de manera que éstas deben ser competitivas. Para ello, es menester que el fabricante presente amplios datos experimentales. El NCCLS (Comité Nacional de Estándares para Laboratorios Clínicos) ha desarrollado protocolos para que sean utilizados por los fabricantes en las pruebas experimentales de los métodos y en el tratamiento estadístico de datos, a fin de exponer indicaciones defendibles en cuanto al rendimiento de sus métodos (1, 3 - 7).

Otras organizaciones llevan a cabo estudios de evaluación de métodos para verificar las indicaciones del fabricante acerca del rendimiento analítico de un método. La FDA ha señalado su intención de probar si el rendimiento de cualquier método comercial coincide con el indicado por el fabricante y ha publicado su propio protocolo. El NCCLS está también desarrollando protocolos de prueba para la verificación de métodos en el laboratorio. Repetir todos los experimentos llevados a cabo por el fabricante perjudica la

efectividad en cuanto a su costo. En lugar de ello, se realizan menos pruebas y se utilizan pruebas estadísticas, como el promedio, desviación estándar, coeficiente de correlación y otras, a fin de determinar si el rendimiento real es igual al indicado por el fabricante (1, 8).

El laboratorio necesita llevar a cabo esta evaluación lo más eficientemente posible, ya que se debe detectar el rendimiento del método con un mínimo de trabajo experimental y si éste fuera inaceptable, sería necesario rechazar el método sin llevar a cabo todos los estudios que consumen tiempo (1 - 6).

3. Requerimientos médicos:

La decisión de aceptar o de rechazar un método de laboratorio debe basarse en la capacidad de dicho método para satisfacer los requerimientos del usuario final: el médico que interpreta los resultados de una prueba de laboratorio de un paciente (1).

D. Requerimientos para la selección de métodos en el Laboratorio:

Antes de seleccionar un procedimiento de análisis se deben definir las metas de calidad. Sólo entonces se podrá revisar la literatura técnica y tomar la decisión de que métodos cumplen mejor las metas. El mismo principio vale para la selección del equipo. Antes de comprar reactivos o equipos se debe reunir y revisar toda la información. Si es un laboratorio ya establecido y desea realizar cambios, se puede hacer uso de la Reingeniería, la cual se refiere al proceso de rediseñar la organización de trabajo para lograr el éxito. Y para esto, deben participar todas las personas que trabajan en el laboratorio, asegurándose que estén completamente entrenados para ubicar las necesidades de los pacientes, de los médicos, del personal, de los métodos de trabajo y de la rutina de trabajo. También debe hacerse una revisión bibliográfica con todos los datos posibles sobre los métodos propuestos y considerar las ventajas y las desventajas que se puedan presentar más adelante (1, 5 - 7).

1. Evaluación de necesidad:

La calidad del servicio prestado por el laboratorio se establece mediante la selección de personal, equipo y métodos analíticos. Existen numerosas consideraciones involucradas en el proceso de selección de métodos, entre ellas todo lo necesario para: entrenamiento del personal, velocidad de análisis, desembolso de capital, precisión, cantidad de personal, espacio requerido, tipo de método, indicaciones del fabricante, utilidades, muestras por hora, reparaciones, linealidad, flexibilidad, exactitud, costo de materiales, interferencias y experiencia de otros colegas (1, 3).

Con frecuencia, la decisión de establecer un nuevo método o instrumento está basada en un requerimiento médico de una nueva prueba que debe ser proporcionada por el laboratorio. Un cambio en la metodología de una prueba puede también ser dictada por los progresos en la tecnología (1, 6, 7)

2. Características de aplicación:

Una vez determinada la necesidad de un nuevo método, se definen todas las características prácticas requeridas del método. Estas se denominan características de aplicación, incluyen requerimientos de tamaño de muestra, tipo de muestra, horario de recolección, calibración automatizada del equipo, revisión de control de calidad en línea autodiagnóstico, velocidad de obtención de resultados, así como también el espacio requerido en el laboratorio, sitio para almacenamiento de reactivos, disponibilidad y capacidad del personal de laboratorio, tiempo disponible para entrenamiento, costo por prueba, seguridad y riesgos ambientales, tiempo de realización de la prueba. Es muy importante el tiempo de entrenamiento para el personal, pues un laboratorio puede tener el más completo analizador, pero si el personal no está capacitado, el laboratorio nunca proveerá un servicio de calidad. Varias organizaciones tienen establecidos estándares de calidad que requieren un nivel prescrito de educación y entrenamiento en sus empleados (1, 4).

Especial énfasis merece el tamaño de muestra para aplicaciones pediátricas, el tiempo que media entre la obtención de muestras y resultados y la necesidad de interrupción de corrida para dedicarse a pruebas "stat", además de la velocidad de análisis de muestras en gran escala para estudios de población. Es esencial que el método seleccionado satisfaga estos requerimientos fundamentales (1).

El costo por prueba ha sido definido como una característica de aplicación. El análisis de costo para la justificación de instrumentos es algo que los encargados de los laboratorios están obligados a hacer, así, demostrar en forma objetiva los beneficios en la adquisición de un nuevo instrumento, ya que sólo decir que la nueva instrumentación será para mejorar el cuidado del paciente no es suficiente, sino debe analizarse cómo, por cuánto, o qué cuidados del paciente serán mejorados y bajo que costo. Uno de los crecimientos positivos del análisis de costos es que ha incrementado la competencia entre vendedores; otro es que el tener un análisis escrito de varios instrumentos y obtener sus especificaciones, lo ayudará a saber exactamente qué oferta debe aceptar y cuál no. Debe recordarse que el efecto de la inversión de capital en el costo de cada prueba, hay que sumar la depreciación y la regla general del 10% de los costos del capital inicial como los gastos del contrato de mantenimiento anual. Entonces se totalizan los costos de mantenimiento y depreciación y se dividen dentro de las pruebas realizadas. Los factores que aumentan los costos directos deben considerarse a los fines de comparación entre los métodos estudiados. Estos incluyen el costo del capital depreciado, costo de reactivos y materiales, costo de servicio y reparación y costo de mano de obra (1 - 3).

3. Características de rendimiento analítico:

El método debe ser definido también en términos de sus capacidades de rendimiento analítico. La evaluación de algunas características básicas de desempeño de la medición completa puede ser una buena medida de la calidad del reactivo. Es necesario que se sepan los valores esperados de estas características. Los resultados se deben interpretar cuidadosamente para que cualquier falla o desviación del valor esperado

se pueda atribuir correctamente a un defecto del reactivo. Los objetivos globales de rendimiento analítico han sido discutidos en términos de error permisible en base a la aplicación médica de la prueba. Otros aspectos de rendimiento que deben ser definidos son el intervalo de utilización del método (linealidad), costo, requerimiento de equipo especializado, entrenar al personal, dificultades técnicas, tiempo requerido, estabilidad de los reactivos, capacidad del analizador para detectar el consumo de reactivos en caso de sustratos enzimáticos, intervalo de referencia esperado, cantidad de error causado por sustancias interferentes, precisión (dentro de las corridas, entre las corridas, interdiaria y total) y exactitud del método (determinada por comparación de resultados con los obtenidos por un método de referencia o estándar) (1 - 4).

Es muy importante que el método seleccionado sea evaluado experimentalmente para determinar si el rendimiento real del método en el laboratorio satisface las necesidades de aplicación médica en la institución del usuario. Las indicaciones del fabricante sobre el rendimiento deben considerarse sólo como un punto de partida para determinar el rendimiento real en el laboratorio (1, 4, 8).

Como próximo paso se debe revisar la bibliografía técnica y profesional para determinar los métodos disponibles y obtener alguna información acerca de sus características de aplicación metodológicas y de rendimiento. Es también útil consultar con colegas sobre sus experiencias y recomendaciones (1, 8).

La última etapa del proceso de selección implica reunir toda la información a fin de llegar a una elección final. El uso de un esquema de clasificación numérica permite obtener una apreciación global más objetiva de los métodos en estudio. El esquema de clasificación numérica puede ser adaptado mediante el uso de factores de ponderación apropiados para las características que son más importantes (1).

E. Evaluación de un método en el Laboratorio

El objetivo del estudio de evaluación de métodos es establecer si el error analítico del método seleccionado es aceptable. El proceso de evaluación de métodos implica la estimación de la magnitud de error analítico para una muestra de un paciente. Los experimentos efectuados en el laboratorio a fin de obtener datos para estimar los errores se eligen porque dan estimaciones cuantitativas de errores aleatorios y sistemáticos con un mínimo de trabajo experimental. Sin embargo, las estimaciones de error obtenidas pueden no ser válidas si están basadas en ciertas presunciones no verdaderas. Estas presunciones incluyen la familiaridad del operador con el procedimiento del método, estabilidad de calibradores, controles reactivos y linealidad de respuesta en todo el intervalo de trabajo (1, 5).

1. Familiarización:

Es esencial que los operadores del método se familiaricen completamente con los detalles del método y la forma de operar el instrumento, antes de recopilar datos que sean utilizados para caracterizar el rendimiento del método (1, 3, 5, 8).

2. Estabilidad:

Durante la evaluación del método se debe considerar la fecha de vencimiento del reactivo indicada por el fabricante, para evitar que se presenten serios problemas de estabilidad de éste que incidan en el rendimiento analítico del método (1, 8).

3. Linealidad:

La Federación Internacional de Química Clínica (IFCC) ha definido el intervalo analítico en un sentido cualitativo, estableciendo que es "el intervalo de concentración u otra cantidad de la muestra en el cual el método es aplicable sin modificación" (1, 2).

F. Experimentos de evaluación final

Los experimentos de evaluación final, son los que llevan más tiempo y proveen potencialmente la información definitiva acerca del rendimiento diario del método en estudio con las muestras reales de pacientes (1).

1. Comparación de métodos:

El experimento de comparación de métodos determina el error sistemático en estudio, utilizando muestras reales de pacientes. Un grupo de muestras de pacientes se analiza mediante el método en estudio y un método comparativo en el que se conoce su precisión y su exactitud. Las diferencias sistemáticas entre los dos métodos se interpretan como errores del método en estudio, si se considera que los resultados del método de comparación tienen escaso o ningún error (errores aleatorios y sistemáticos insignificantes). Por ende, el método comparativo debe ser de la mayor calidad posible, de modo que los errores no sean atribuidos, equivocadamente, al método en estudio (1,5).

En la práctica, el método comparativo es con frecuencia el método de rutina en el laboratorio, pero no es de calidad de referencia. Es útil comparar los resultados del método en estudio con los del método de rutina, pero las diferencias entre ambos métodos deben ser interpretadas cautelosamente, a menos que se sepa que la calidad del método comparativo es elevada (1, 7).

Las muestras deben ser cuidadosamente seleccionadas a fin de que representen en forma eficiente la carga de trabajo de rutina; por lo general suele ser necesario un pre-análisis mediante el método de rutina. Las muestras se analizan con cada método por duplicado. Los resultados deben examinarse con cuidado y representarse diariamente. Las evaluaciones de los métodos en estudio y comparativo deben efectuarse al mismo tiempo o lo más cerca posible uno del otro. Si esto no es posible, las muestras deben conservarse de manera que garanticen la estabilidad de la variable analítica (1).

Existen a nivel mundial muchas publicaciones en las cuales se utilizan diferentes combinaciones de fórmulas estadísticas para realizar las evaluaciones de métodos, así por ejemplo, la prueba de Wilcoxon para determinar diferencias significativas en la variabilidad entre las mediciones con datos corregidos y no corregidos. Así también se utiliza el método de Passing y Bablok para mostrar que los métodos son analíticamente comparables. También se

utilizan paquetes de software SPSS 7.5. La corrección de Bonferroni es usada en otros estudios.

El método de residuales, por el análisis de error Grid y por los coeficientes de variación para medidas en serie, se utiliza en diferentes estudios comparativos. En algunos estudios de comparación de métodos, los datos están sujetos a una transformación logarítmica para el rendimiento de la distribución gaussiana, y ejecutar ANOVA en la transformación de los valores seguidos por el procedimiento de la comparación múltiple de Bonferronis, para las diferencias estadísticas entre pares de grupos. El análisis de regresión lineal se usa para el estudio de comparación. También se utilizan las gráficas ROC para observar las diferencias significativas, graficar sensibilidad y especificidad, además de los valores predictivos. Al hacer la comparación de dos ensayos homogéneos, se realizan métodos de estadística descriptiva como la media, desviación estándar, coeficiente de correlación de concordancia, que se pueden calcular por medio del programa de Microsoft Excel, Versión 5.0 (11 - 22).

G. Técnicas espectrales:

1. Espectrofotómetro de haz simple:

El aparato requerido puede ser dividido en 5 componentes básicos:

- a) una fuente estable de energía radiante;
- b) un selector de longitud de onda;
- c) un dispositivo para contener el recipiente transparente (cubeta), que contiene la solución a ser medida;
- d) un detector de energía radiante, y
- e) un dispositivo para leer la señal eléctrica generada por el detector.

Si se usa un filtro como selector de longitud de onda, se dispone sólo de luz monocromática a longitudes de onda discretas y el instrumento se denomina "Fotómetro". Si en cambio se dispone de un monocromador (esto es un prisma o una red de difracción) como selector, el instrumento puede proveer luz monocromática en un intervalo continuo

de longitudes de onda y se denomina "Espectrofotómetro" o "Espectrómetro". Son a menudo instrumentos de doble haz que poseen dos portacubetas, uno para la muestra y otro para el blanco (1).

H. **Automatización en análisis clínicos:**

La automatización, aplicada a la química clínica, puede definirse como el automovimiento o transferencia mecánica de una muestra dentro de un complejo sistema de armado industrial que constituye una sucesión de máquinas autoactivas, cada una de las cuales completa una etapa especificada en el proceso analítico total, desde la muestra en bruto hasta el resultado analítico. Una segunda definición es la aplicación de procedimientos totalmente automatizados en la eficiente realización y control de operaciones que involucran una secuencia de procesos complejos estandarizados o repetitivos en gran escala (1).

Si bien el término de "automatización" implica el procesamiento de gran número de muestras, los principios inherentes a la automatización pueden aplicarse asimismo al análisis de muestras aisladas pero por lo común está altamente automatizado (1, 2, 4, 8).

La creciente presión económica para reducir los costos operativos hará atractivos los instrumentos que mejoren la productividad. Estos han de tender a ser analizadores selectivos, conservadores de muestras y de reactivos costosos, capaces de llevar a cabo gran número de pruebas. Las áreas que requieren perfeccionamiento son las de preparación e identificación de muestras y reducción de transcripción manual de resultados. A estos fines, las computadoras de laboratorio que leen códigos de barra y transcriben datos se harán comunes y los instrumentos se verán aliviados de ciertas tareas que se realizan mejor sobre la base de computadoras, si bien la interacción entre los dos se ha de volver más elaborada. Los volúmenes de reacción han de continuar disminuyendo y con ello el costo de los reactivos. Los instrumentos espectrofotométricos continuarán dominando. Los nuevos instrumentos han de ser higiénicos y mecánicamente sencillos, requiriendo un mínimo de mantenimiento diario. Tendrán un repertorio relativamente amplio de pruebas, de manera que en el laboratorio se han de requerir menos

secciones. El costo de capital se verá aumentado debido a las características que reducirán los costos operativos y de mano de obra. La comunicación entre el operador y el instrumento se ha de volver mucho más conveniente (1).

IV. JUSTIFICACIÓN

En todos los laboratorios clínicos se hace necesario evaluar los nuevos métodos que pueden ser utilizados para trabajar en las diferentes áreas de trabajo, en especial los de química clínica. Es necesario determinar la calidad de los nuevos métodos introducidos al mercado nacional, los cuales ofrecen ventajas respecto a los métodos tradicionalmente conocidos, tales como rapidez y sencillez en su utilización y precios más accesibles, en beneficio tanto para el laboratorio como para el paciente.

No se ha realizado trabajos anteriores en nuestro país sobre la evaluación de métodos, por lo que es de sumo interés hacer dicha evaluación entre dos métodos: uno de alta confiabilidad y alto precio y otro que, aunque presenta casi igual grado de confiabilidad, ofrece un precio más reducido, y como consecuencia de dicha evaluación, elaborar una guía práctica para que los laboratorios interesados puedan efectuarla bajo sus propias condiciones.

V. OBJETIVOS

Los objetivos principales del presente trabajo de tesis se resumen en dos puntos principales:

- A. Determinar la correlación analítica entre los reactivos para química clínica de Merck® y DCL®, aplicados en diez analitos distintos, a fin de establecer si la utilización de los reactivos de la segunda marca, pueden sustituir a la primera en los diferentes analitos que se procesaron en este estudio.

- B. Proponer una guía práctica que pueda ser utilizada fácilmente por los laboratorios clínicos que desean comparar reactivos de uso conocido y poder demostrar si el reactivo nuevo se desempeña igual que el que está en uso, con el propósito de utilizar otros reactivos más accesibles en cuanto a su costo, sin sacrificar con ello la calidad de las pruebas realizadas.

VI. HIPÓTESIS

Los reactivos para química clínica de DCL®, correlacionan adecuadamente con los resultados obtenidos al utilizar los reactivos de Merck®, por lo que pueden utilizarse en el laboratorio clínico con la misma seguridad y confianza de calidad del reactivo de Merck® a un costo más bajo.

Hipótesis nula = H_0 : los resultados obtenidos con ambas marcas de reactivos son iguales.

Hipótesis alterna = H_a : los resultados obtenidos con ambas marcas de reactivos son diferentes.

VII. MATERIALES Y METODOS

A. Universo de trabajo

Reactivos para química clínica de marca Merck® y DCL® para: bilirrubina directa, bilirrubina total, colesterol total, creatinina, glucosa, nitrógeno de urea, triglicéridos; transaminasa glutámico oxalacética (ASAT), transaminasa glutámico pirúvica (ALAT) y fosfatasa alcalina.

1. Muestra:

Se analizaron 434 muestras de sueros de pacientes, 30 muestras para la bilirrubina directa, 33 muestras para la bilirrubina total, 45 muestras para el colesterol total, 45 muestras para la creatinina, 53 muestras para la glucosa, 31 muestras para el nitrógeno de urea, 57 muestras para los triglicéridos, 41 muestras para la transaminasa glutámico oxalacética, 53 muestras para la transaminasa glutámico pirúvica y 44 muestras para la fosfatasa alcalina. Las muestras de sueros para los análisis, se obtuvieron de los pacientes que asisten al Laboratorio Clínico del IGGS zona 9, Laboratorio Clínico de Unidad Nacional de Atención al Enfermo Renal Crónico (UNAERC) y el Laboratorio Clínico de APROFAM.

B. Materiales

1. Recursos humanos:

- a) Julia Isabel Alvarado Egli (tesista)
- b) Licenciada Alba Marina Valdés de García (asesor de tesis)
- c) Licenciado Rafael Armando Elgueta Spinola (co-asesor de tesis)

2. Recursos Institucionales:

- a) Merck® S. A.
- b) Laboratorio Clínico del IGGS zona 9
- c) Laboratorio Clínico de la Unidad Nacional de Atención al Enfermo Renal Crónico (UNAERC)

d) Laboratorio Clínico de APROFAM

3. Recursos materiales:

a) Materiales:

- i) tubos para transportar las muestras
- ii) gradillas
- iii) hielera
- iv) guantes
- v) etiquetas para identificación

b) Reactivos:

i) Reactivos de Merck®:

bilirrubina directa (B1A01372), bilirrubina total (B1A01372), colesterol total (1.14830.0001), creatinina (1.03385.0001), glucosa (B1A02475), triglicéridos (1.14856.0001), nitrógeno de urea (B1A02374), ASAT (1.14829.0001), ALAT (1.14820.0001), fosfatasa alcalina (1.14858.0001), calibrador para bilirrubinas (DC-17), calibrador SMT (1.19720.0002), Qualitrol HSN (1.10937.0001), Qualitrol HSP (1.10938.0001).
Sputofluol 10%, HCl 0.1 N.

ii) Reactivos de DCL®:

bilirrubina directa (202-S7), bilirrubina total (204-S7), colesterol total (234-60), creatinina (221-30), glucosa (235-60), triglicéridos (236-60), nitrógeno de urea (239-10), ASAT (319-10), ALAT (318-10), fosfatasa alcalina (309-10).

c) Equipo:

- i) Merck® Vitalab Selectra 2
- ii) Refrigerador
- iii) Pipetas calibradas (100 - 1,000 ul)

C. Método

1. Identificación de las metodologías de trabajo de los reactivos usados:

Se obtuvo información sobre la historia de la empresa Merck® y DCL®, por ser los fabricantes de los reactivos utilizados en este estudio de comparación. Además, se estudiaron los insertos de cada una de las metodologías de las pruebas designadas para trabajar. Esta información se utilizó para programar el equipo automatizado donde se realizaron las pruebas, entre ellas esta el principio de la reacción, presentación de los reactivos, preparación de los reactivos si fuera necesario, temperatura de trabajo, volumen de muestra, volumen de reactivo, longitud de onda a la que se lee la reacción, cálculo de los resultados, valores de referencia, linealidad, precisión y exactitud (1, 3-9, 25, 26) (ver anexo 1-10).

2. Recolección de muestras:

La muestra se obtuvo por punción venosa, separando el suero del coágulo por centrifugación y almacenando estos sueros ya identificados y clasificados en el congelador. En el caso de las muestras ictericas, los tubos fueron envueltos con papel de aluminio para protegerlos de la luz. Las muestras se transportaron en un recipiente adecuado para mantener la temperatura necesaria, y luego fueron congeladas en el laboratorio hasta completar el número total de muestras, planificando trabajar las pruebas que tuvieran las mismas características y por ambos métodos el mismo día (1-4).

3. Principios de los reactivos de diagnóstico Merck®:

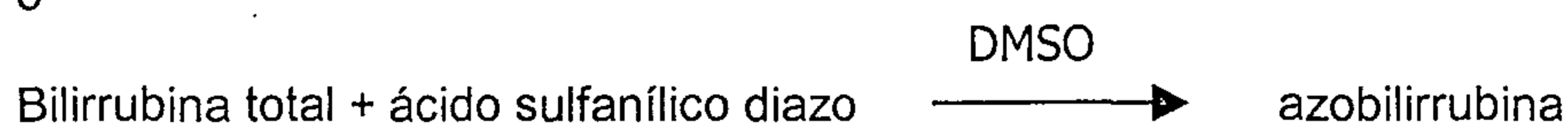
Es un grupo de empresas de actividad a nivel mundial en el campo de productos farmacéuticos y químicos de alta calidad, con tecnología específica para producir reactivos certificados por las normas ISO 9001 (27).

El fundamento de la prueba, para el análisis de la **bilirrubina directa y bilirrubina total** es que la azobilirrubina producida por la reacción entre las bilirrubinas y la sal de diazonio del ácido sulfanilico presenta una absorción máxima a 555 nm en medio ácido. La intensidad de la coloración es proporcional a la cantidad de bilirrubina que ha

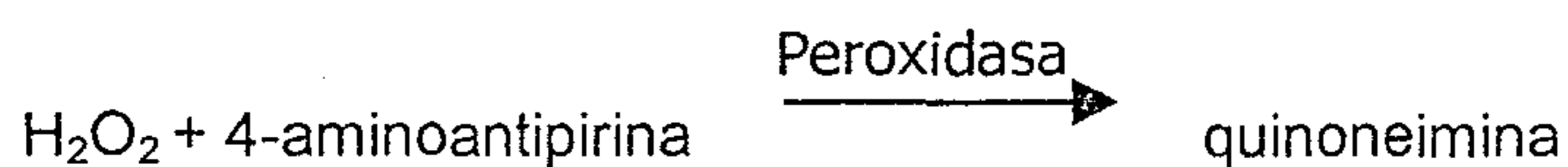
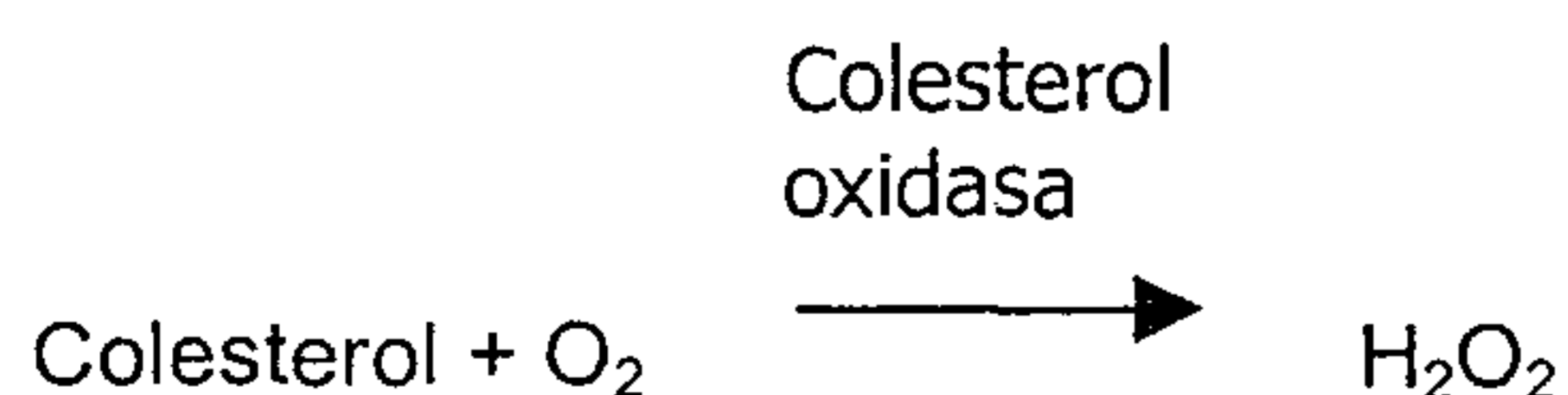
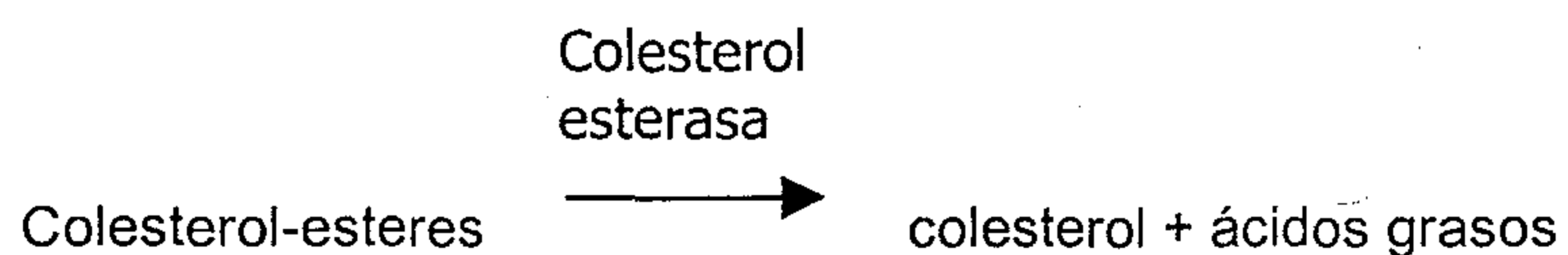
reaccionado. En ausencia de un acelerador, solo reaccionan las bilirrubinas conjugadas. En presencia de un acelerador, el dimetilsulfoxido (DMSO), las bilirrubinas no conjugadas participan también en la reacción que determina entonces la proporción de bilirrubina total (25).



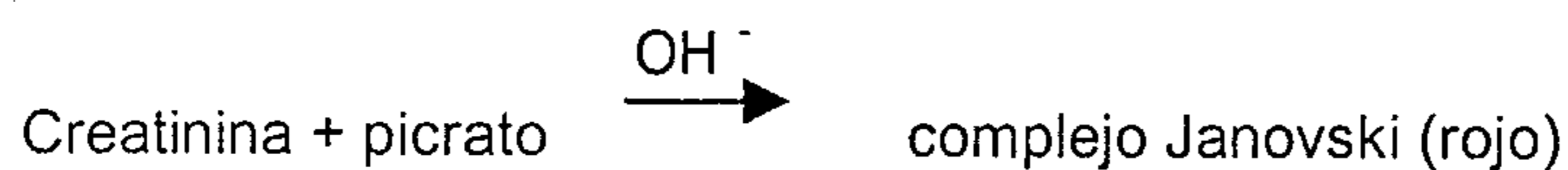
ó



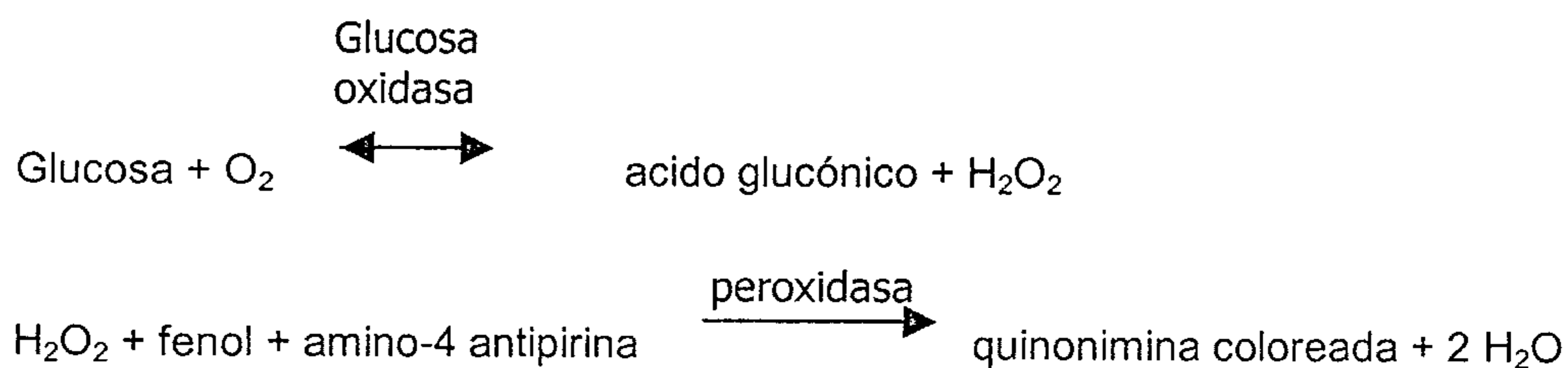
El fundamento para la determinación de **colesterol total**, es que este y sus esteres son separados de las lipoproteínas por detergentes. Los esteres de colesterol son hidrolizados por el colesterol esterasa. El colesterol producido junto con el colesterol libre, son oxidados por medio de colesterol oxidasa, formando peroxido de hidrogeno, este ultimo reacciona con 4-aminoantipirina y alcohol salicílico en presencia de peroxidasa, produciendo una quinoneimina coloreada (25).



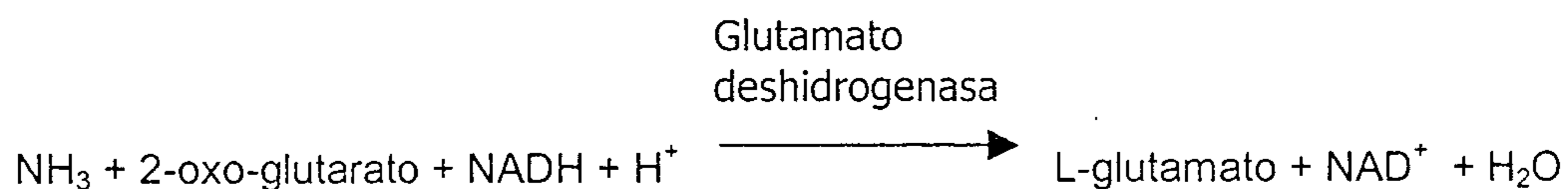
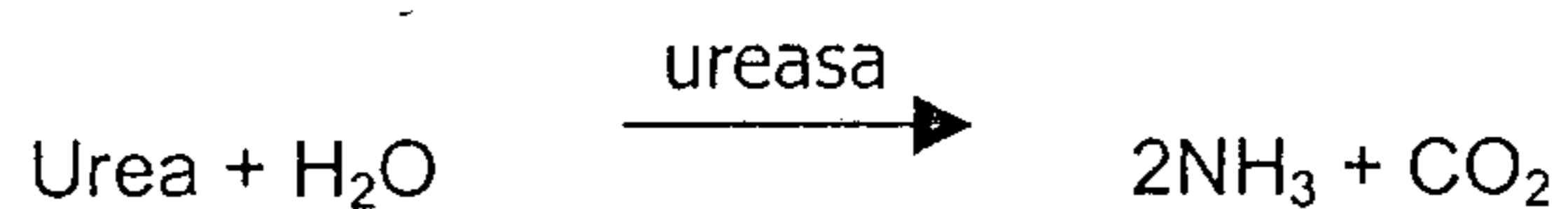
En la **creatinina**, el principio es, que en solución alcalina, la creatinina forma con el ácido pícrico un compuesto amarillo-naranja. Debido a la baja concentración de ácido pícrico utilizada en este método, una precipitación de proteínas, no es necesario. La concentración del colorante formado, depende de un determinado intervalo de tiempo. Como resultado de la rápida reacción entre la creatinina y el ácido pícrico, las reacciones secundarias no causan interferencias. Este método se caracteriza por la alta especificidad (25).



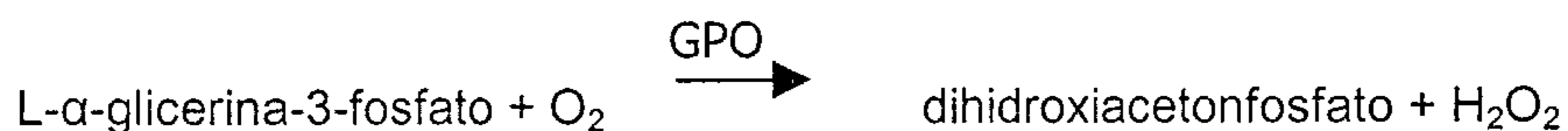
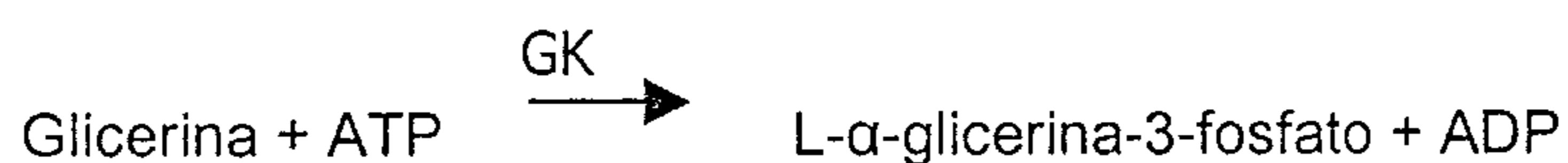
El fundamento de la prueba de la **glucosa**, es que la intensidad de la coloración a 500 nm es proporcional a la concentración de glucosa en la muestra. La reacción es la siguiente: la glucosa en presencia de oxígeno, por la glucosa oxidasa, forma ácido glucónico y peróxido de hidrogeno, lo cual más fenol y amino-4 antipirina, en presencia de peroxidasa forma una quinonimina coloreada y agua (25).



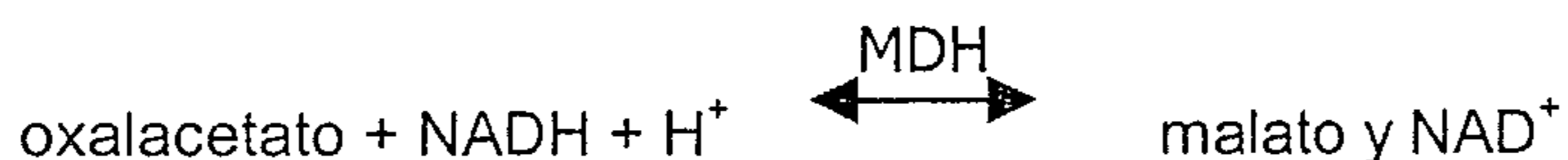
La metodología usada para la determinación de **nitrógeno de urea**, es la siguiente, la disminución en la absorbancia a 340 nm junto con la formación de NADH es directamente proporcional a la concentración de nitrógeno de urea en la muestra; la reacción es la siguiente, la urea y agua, en presencia de ureasa, forma NH_3 y CO_2 , si se le agrega 2-oxoglutarate y NADH e H^+ , en presencia de glutamato deshidrogenada, forma L-glutamato, NAD y agua (25).



El fundamento para la prueba de los **triglicéridos** es que mediante las lipasas especiales, los triglicéridos se hidrolizan enzimáticamente en glicerina y ácidos grasos libres. La glicerina se transforma según las siguientes reacciones (25):



En la prueba de **transaminasa glutámico oxalacética**, la reacción es la siguiente:



La disminución de NADH es medido fotométricamente y es directamente proporcional a la actividad de la transaminasa glutámico oxalacética (25).

La determinación de la **transaminasa glutámico pirúvica** según las recomendaciones de la federación internacional de Química clínica tienen el siguiente fundamento:





La velocidad de disminución del NADH se mide fotométricamente y es directamente proporcional a la actividad de la transaminasa glutámico pirúvica en la muestra (25).

El fundamento para la prueba de **fosfatasa alcalina** es que:



La velocidad del aumento de 4-nitrofenolato se determina fotométricamente y es directamente proporcional a la actividad de AP en el material de las muestras (25).

El **calibrador SMT** se usa para calibrar las pruebas en la medición de sustratos y electrolitos en analizadores multiparamétricos. Es un suero liofilizado y estable de origen bovino. Las concentraciones de los sustratos y electrolitos se encuentran dentro del rango de normalidad o en el límite entre normal y patológico (25).

El **Qualitrol HS N** es un suero control normal, preparado de un pool de plasma humano, con 47 datos analíticos de los más importantes que se incluyen en la rutina de química clínica en el laboratorio. El **Qualitrol HS P** es un suero control patológico con 45 componentes. Ambos están aprobados por la FDA, y sin la presencia de anticuerpos de HIV 1 + 2, HCV, y el antígeno de superficie de la hepatitis B. Aunque siempre se deben manipular como material infeccioso (25).

4. Principios de los reactivos de diagnóstico DCL®:

Desde 1970, DCL® ha creado reactivos y productos de diagnóstico de acuerdo a las regulaciones de la FDA. De conformidad con el sistema de calidad, cuenta con el certificado estándar ISO 9001-1994 (certificado 004229) (26,28).

El fundamento de la prueba, para el análisis de la **bilirrubina directa y bilirrubina total** es que el ácido sulfanílico reacciona con el nitrito de sodio para formar ácido

sulfanílico diazotado. La bilirrubina directa reacciona con el ácido sulfanílico para formar azobilirrubina (26).

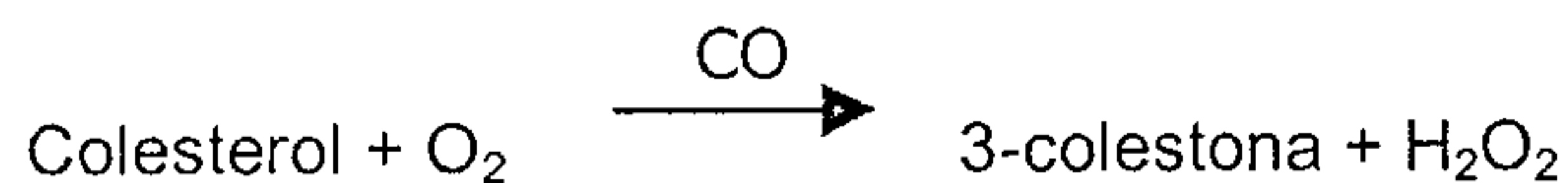


ó

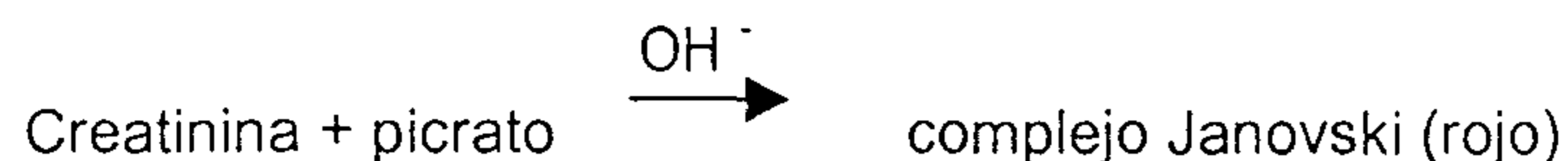


La absorbancia de la mezcla de reacción a 555 nm es directamente proporcional a la concentración de bilirrubina indirecta (26).

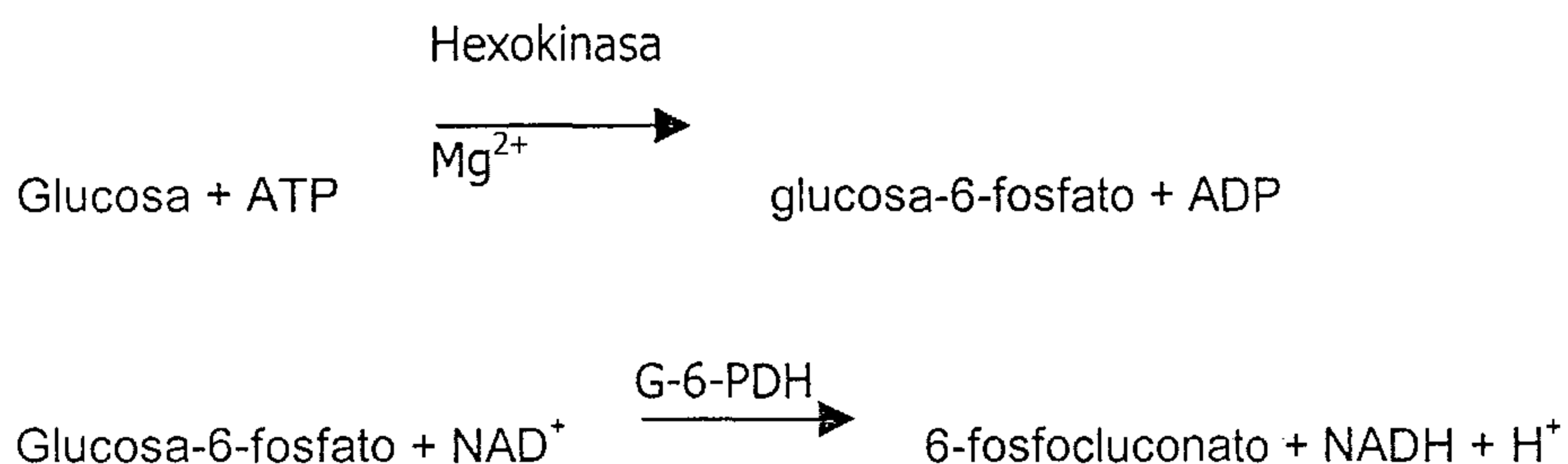
El fundamento para la determinación de **colesterol total**, es que los ésteres de colesterol son hidrolizados a colesterol libre por el colesterol esterasa (CE). El colesterol libre es oxidado por el colesterol oxidasa (CO) a 3-colestona y H₂O₂. El peróxido de hidrógeno producido reacciona con la 4-aminoantipirina y el p-hidroxibenzoato en presencia de peroxidasa para formar un cromógeno con un máximo de absorbancia de 505 nm. La intensidad de color producido es directamente proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra (26).



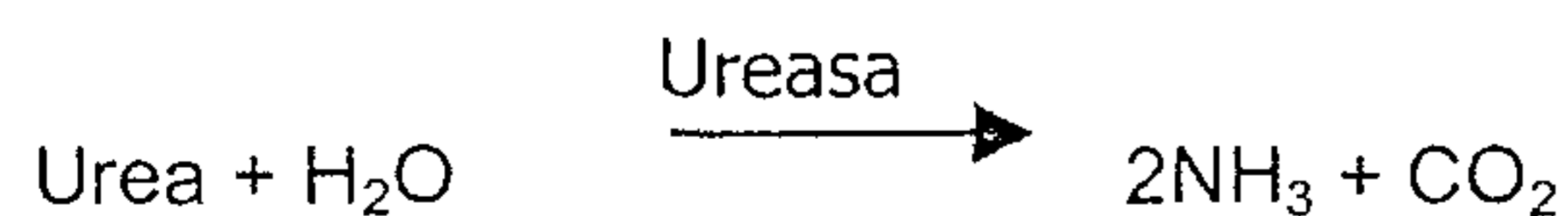
En la **creatinina**, el principio es que en un eh alcalino, la creatinina reacciona con el picrato para formar el complejo de Janousky (complejo creatininapicrato), el cual absorbe a 510 nm y es proporcional a la concentración de creatinina en la muestra. El procedimiento puede calibrarse usando un estándar que sirva como directriz (26).



El fundamento de la prueba de la **glucosa**, es que la glucosa es fosforilada por la hexoquinasa (HK) en presencia de adenosintrifosfato (ATP) y magnesio para formar glucosa-6-fosfato (G-6-P) y adenosin difosfato (ADP). El G-6-P es oxidado por glucosa-6-fosfato deshidrogenada (G-6-PDH) en presencia de nicotinamida adán dinucleótida (NAD) produciendo 6-fosfogluconato y NADH. La formación de NADH causa un incremento en la absorbancia a 340 nm que es directamente proporcional a la concentración de glucosa en la muestra (26).

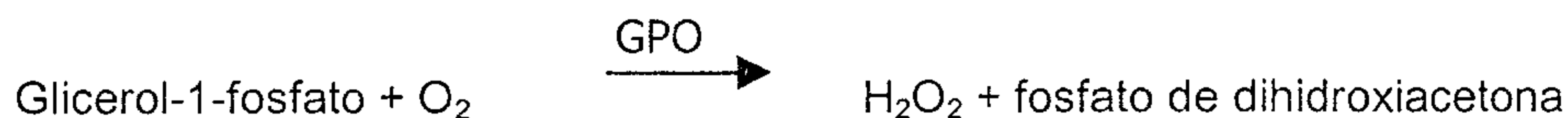
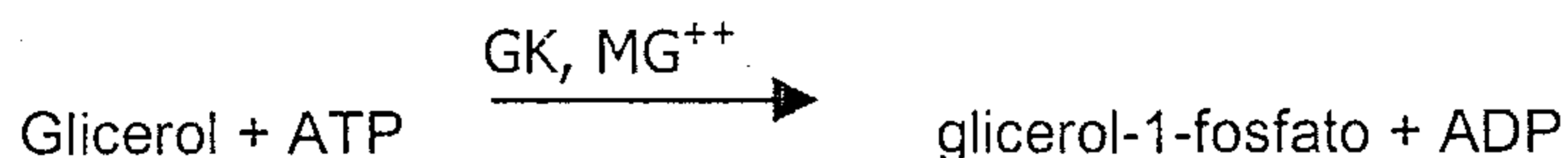


La metodología usada para la determinación de **nitrógeno de urea**, es la siguiente: en el procedimiento de Talke y Schubert, la urea se hidroliza primeramente a través de la ureasa para producir amoníaco y bióxido de carbono. El amoníaco que se produce en la primera reacción reacciona con el 2-oxoglutarato y con el cofactor reducido en presencia de glutamato de deshidrogenasa (GLDH) para producir glutamato y cofactor (II). El decremento en la concentración del cofactor reducido es monitoreado a 340 nm y es proporcional a la concentración de la urea en la muestra (26).



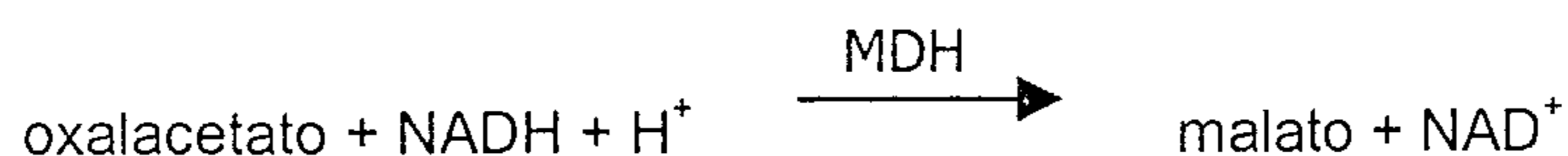


El principio para la prueba de los **triglicéridos** es que los triglicéridos del suero son hidrolizados, formando glicerol y ácidos grasos a través de la lipasa. En presencia de ATP y de glicerol cinasa (GK), el glicerol se convierte en glicerol-1-fosfato y la oxidasa de fosfato de glicerol, y la oxidasa de fosfato de glicerol oxida al glicerol-1-fosfato para producir peróxido de hidrógeno. La condensación del peróxido de hidrógeno con el DHBS y la 4-amino-antipirina en presencia de la peroxidasa produce un complejo coloreado de quinoneina. El incremento en la absorbancia a 520 nm debido a la formación de quinoneimina es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos en la muestra (26).

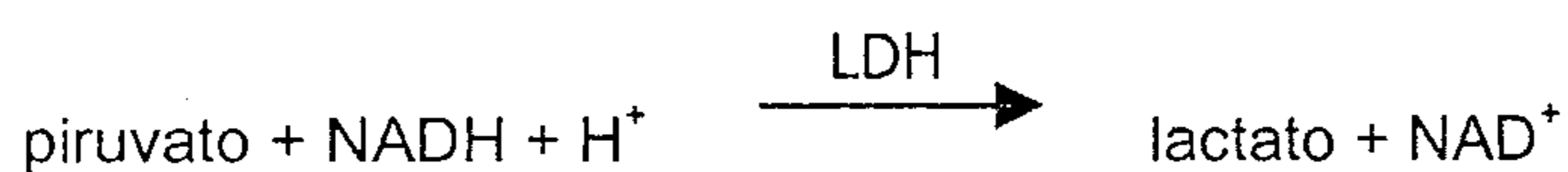
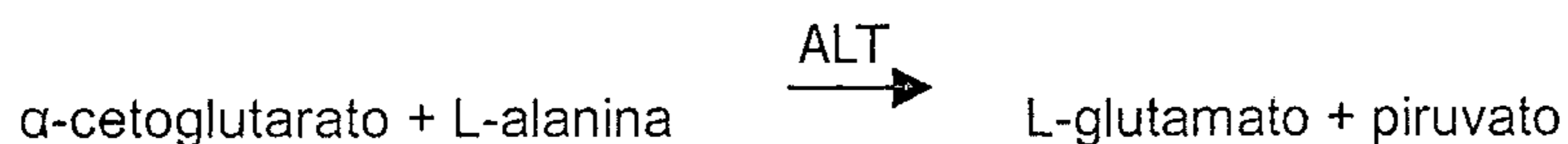


En la prueba de **transaminasa glutámico oxalacética**, la AST cataliza la reacción del 2-oxoglutarato y L-aspartato a oxalacetato y L-glutamato. La MDH (malato deshidrogenasa) enseguida cataliza la oxidación del NADH a NAD⁺. La disminución de la

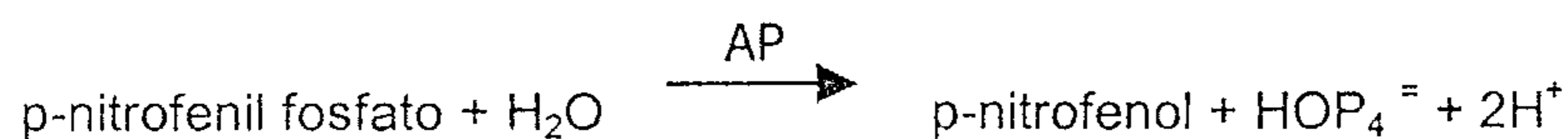
absorbancia de la mezcla de reacción a 340 nm, debido a la oxidación del NADH, es directamente proporcional a la actividad de la AST (26).



La determinación de la **transaminasa glutámico pirúvica** La ALT cataliza la conversión de L-alanina y alfa cetogluturato a piruvato y glutamato. La lactato deshidrogenasa cataliza la oxidación de NADH a NAD. La disminución de la absorbancia de la mezcla de reacción a 340 nm, debido a la oxidación del NADH, es directamente proporcional a la actividad de la ALT (26).



El fundamento para la prueba de **fosfatasa alcalina** es que: La fosfatasa alcalina hidroliza el p-nitrofenil fosfato (p-NPP) para formar el cromógeno p-nitrofenol. El incremento en la absorbancia a 405 nm debido a la formación del p-nitrofenol es proporcional a la actividad de fosfatasa alcalina (26).



5. Procesamiento automatizado de muestras:

Las muestras se procesaron en el Merck® Vitalab Selectra 2, se programó según las indicaciones de los insertos para cada uno de los analitos, con la cantidad de reactivo y muestra necesarios, temperatura de trabajo, tiempo de incubación, longitud de onda, filtro, límites de absorbancia, cálculos, límites de dilución y valores de referencia.

Se hizo un plan de trabajo para procesar los diferentes analitos con las respectivas muestras que habían sido recolectadas para ellos.

Para comenzar a trabajar diariamente, se encendía el Merck® Vitalab Selectra 2, se programaba el blanco de rotor para asegurar la limpieza de las cubetas, se programaban las pruebas y las posiciones de los reactivos, indicando cuales necesitaban blanco de reactivo, el calibrador, los controles Qualitrol HS P (con valores patológicos) y un Qualitrol HS N (con valores normales). Se revisó que los valores de los calibradores y de los controles estuviesen dentro de los rangos aceptables que trae cada inserto, y después, se programaban las posiciones de las muestras para ser procesadas. Después de esto, el aparato hacía una limpieza con Sputofluol al 10% y HCl 0.1N para limpiar entre una muestra y otra los tubos de aspirado.

a) Equipo automatizado Merck® Vitalab Selectra 2:

El Merck® Vitalab Selectra 2 es un analizador de acceso al azar (Random Access) totalmente selectivo. Se pueden programar libremente hasta 60 parámetros, pudiéndose realizar simultáneamente 32 de ellos para cada muestra. Los tipos de mediciones que pueden realizarse son: cinéticas, mediciones a dos puntos y a punto final, con calibraciones lineales o no lineales. A punto final se pueden realizar mediciones bicromáticas (24).

El equipo esta constituido por:

i). Sistema de dosificación:

Rotor con 24 posiciones para frascos de 25 ml y 8 posiciones para frascos de 7 ml, con un consumo promedio de reactivo de 300 ul por técnica. Compartimiento de

reactivos refrigerado. Cánula de reactivos atemperada y con sensor de nivel, y volumen programable de reactivo: hasta 400 microlitros por técnica (24).

ii) Sistema de muestras:

Rotor de muestras con dos segmentos: sector exterior con 51 posiciones para muestras de rutina, 3 posiciones para urgencias, 10 para calibradores (incluyendo blanco), 6 muestras pediátricas y 4 para controles (en todas las posiciones pueden colocarse tubos primarios de 5 ml o copas de muestra). Volumen de muestra de 2 a 30 microlitros por técnica (programables en pasos de un microlitro). Cánula de muestra con sensor de nivel y agitador integrado (24).

iii) Sistema de pipeteo:

Dos microjeringas Hamilton: (muestra 100 microlitros - reactivo 1000 microlitros) (24).

iv) Rotor de reacción:

Rotor semidesechable con 48 cubetas. Paso óptico de 7 mm para un volumen mínimo de medición de 250 microlitros (24).

v) Unidad de lavado:

Lavado de cubetas con aproximadamente 4 x 400 microlitros de agua. La unidad de lavado viene equipada con sensores de nivel (24).

vi) Fuente de luz:

Lámpara de cuarzo-yoduro 12V - 20W (24).

vii) Rango de longitudes de onda:

Selección automática de longitudes de onda mediante un rotor de 8 filtros (340, 376, 405, 436, 505, 546, 578 y 620 nm). Anchura media de banda de 8 a 12 nm (24).

viii) Temperatura de medición:

37° C +/- 0.1° C. Controlado con elementos Peltier (24).

ix) Modos de medición:

Modos mono y bi-reactivo. Medición de técnicas cinéticas de manera continua con chequeo de linealidad (22 puntos de medición). Mediciones bicromáticas con/sin blanco de muestra, con/sin blanco de reactivos. Mediciones a dos puntos. Gráfica con todos los puntos medidos. Repetición automática con dilución de la muestra. Curvas no lineales con estándares (24).

x) Ciclo:

Modo monoreactivo: 20 segundos. Velocidad: 180 pruebas por hora. Modo bireactivo: 27 segundos. Velocidad 133 pruebas por hora (24).

xi) Control de calidad:

Hasta 15 controles en total y 3 controles por método. Análisis de datos por medir de la regla de Westgard y gráficas de Levy-Jennings (24).

xii) Computador:

IBM PC compatible. Pantalla de 12 pulgadas. Disquete de 3.5". Teclado AT 101 teclas. Impresora térmica de 40 columnas. Impresión de informes formateable (24).

xiii) Otra información:

Capacidad de operación: modo dependiente hasta un máximo de 180 determinaciones/hora. Random. Espacios para emergencias y pruebas pediátricas.

Equipo abierto: totalmente programable por el usuario. Facilidades de manejo: completamente computarizado y simple de manejar a través de menús en pantalla (24).

6. Diseño de la investigación:

a) Muestra:

La recolección de muestras se hizo por conveniencia, para que los datos fueran representativos, el mínimo de muestras a trabajar eran 30 sueros por analito, de los cuales 15 debían ser patológicos y 15 normales, y quedo de la siguiente manera:

30 muestras para la bilirrubina directa, 33 muestras para la bilirrubina total, 45 muestras para el colesterol total, 45 muestras para la creatinina, 53 muestras para la glucosa, 31 muestras para el nitrógeno de urea, 57 muestras para los triglicéridos, 41 muestras para la transaminasa glutámico oxalacética, 53 muestras para la transaminasa glutámico pirúvica y 44 muestras para la fosfatasa alcalina. Es decir, que se procesaron un total de 434 muestras, las cuales fueron recolectadas en el Laboratorio Clínico del IGGS zona 9, Laboratorio Clínico de Unidad Nacional de Atención al Enfermo Renal Crónico (UNAERC) y Laboratorio Clínico de APROFAM.

b) Variables:

Dependientes: los resultados obtenidos por los 10 analitos con los reactivos de Merck® y los 10 analitos con los reactivos de DCL®.

Independientes: las metodologías utilizadas para cada analito, por Merck® y por DCL®.

c) Diseño:

Se realizó un diseño pareado: cada muestra simultáneamente por ambas marcas de reactivos para todos los analitos.

d) Criterios de inclusión:

Se utilizaron todas las muestras de sueros de pacientes que tenían como mínimo 2 ml de suero.

Al recolectar las muestras patológicas para transaminasas y bilirrubinas se aceptaron muestras ictericas.

Para las muestras patológicas de colesterol y triglicéridos se aceptaron muestras lipémicas.

7. Análisis de resultados:

Se verifico que los resultados obtenidos con los controles Qualitrol HS N y Qualitrol HS P, estuvieran dentro de los rangos de referencia aceptables que trae cada inserto, para poder trabajar con las muestras de sueros.

Para los datos obtenidos con las muestras y procesadas con ambos reactivos en cada uno de los analitos, se realizó un promedio, la desviación estándar, prueba de "t" de student para un diseño pareado a 2 colas, con su respectiva probabilidad (valor de "p") y el coeficiente de correlación de concordancia.

Toda prueba estadística de hipótesis supone un "error" aleatorio, como consecuencia del muestreo realizado. A medida que dos grupos se hacen diferentes entre sí, ese error se reduce hasta caer en la "región de rechazo de la hipótesis", cuyo valor es de 0.05 para los efectos de este estudio, en vista de que se pretende alcanzar un nivel de confiabilidad equivalente al 95%.

En el análisis de la prueba de "t" de student, si el valor de "t" calculado es mayor o igual que el valor de "t" crítico, entonces la hipótesis nula se rechaza, el valor de "t" critico se toma de una tabla y depende del grado de libertad. Si el valor de "p" > 0.05 entonces se acepta la hipótesis nula, si $p \leq 0.05$ entonces se rechaza la hipótesis nula.

Para interpretar los coeficientes de correlación de concordancia se tomó el siguiente valor de referencia:

Correlaciones de 0 – 0.25 = correlación escasa o sin correlación.

Correlaciones de 0.25 – 0.50 = algún grado de correlación.

Correlaciones de 0.50 – 0.75 = moderada a buena.

Correlaciones > 0.75 = muy buena a excelente (10).

III. RESULTADOS

De los 10 analitos usados en este estudio, 5 no presentaron diferencias estadísticas significativas, estos son: bilirrubina directa, bilirrubina total, nitrógeno de urea, transaminasa glutámico oxalacética, transaminasa glutámico pirúvica, en estas metodologías, la prueba de "t", el valor de "p" y el coeficiente de correlación de concordancia se encontraban dentro de los rangos de referencia. Los otros 5 analitos usados para realizar la comparación de reactivos entre Merck® y DCL®, que son colesterol total, creatinina, glucosa, triglicéridos y fosfatasa alcalina presentaron diferencias estadísticas significativas, ya que los valores de "t" se encontraban mas altos que el valor de "t" crítico, el valor de "p" menor de 0.05 y el coeficiente de correlación de concordancia mas bajo que el aceptado.

En la tabla 1, se presenta el promedio, la desviación estándar, el valor de "t", el valor de "p" y el coeficiente de correlación de concordancia de los 10 analitos utilizados para la comparación de los reactivos de Merck® y DCL®.

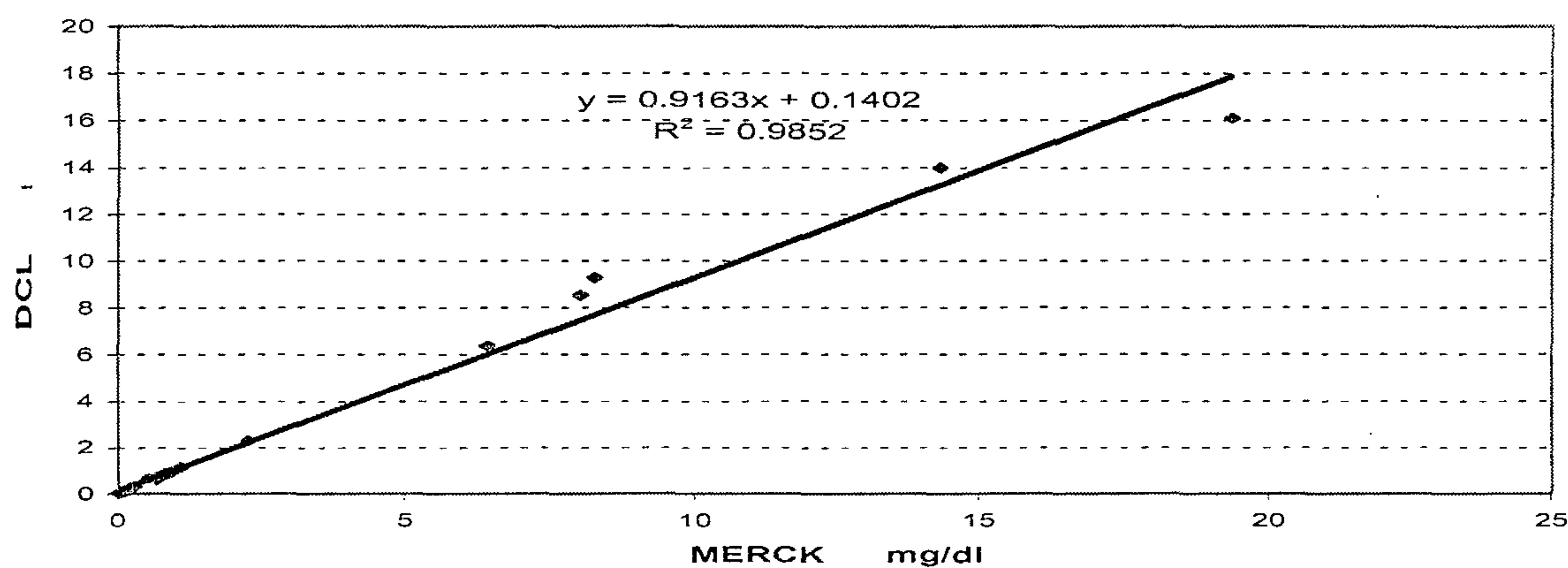
Tabla 1. Resumen de los resultados obtenidos en la comparación de los reactivos de Merck® y DCL®.

	PRUEBA	Promedio			Desviación Estándar			valor de "t"	valor de "p"	Coeficiente Correlación Concordancia
		Merck®	DCL®	diferencias	Merck®	DCL®	diferencias			
1	Bilirrubina directa	2.21	2.16	0.04	4.6117	4.2573	0.6458	0.338	0.7378	0.9292
2	Bilirrubina total	1.81	1.79	0.02	2.6148	2.599	0.1618	0.714	0.4804	0.9698
3	Colesterol	231.09	214.62	16.47	93.97	93.407	17.962	6.145	<0.00001	0.3697
4	Creatinina	3.52	3.39	0.13	4.139	4.068	0.2471	3.611	0.0008	0.9686
5	Glucosa	124.57	121.63	2.94	79	74.49	6.11	3.504	0.001	0.9096
6	Nitrógeno de urea	36.57	37	0.43	27.58	28.88	2.004	1.194	0.2418	0.9625
7	Triglicéridos	264.96	245.11	19.86	219.41	194.84	41.576	3.604	0.0007	0.4658
8	Transaminasa glutámico oxalacética	71.02	69.98	1.05	95.43	92.657	5.683	1.183	0.2438	0.9649
9	Transaminasa glutámico pirúvica	68.08	69.25	1.17	124	114.07	14.162	0.601	0.5505	0.9362
10	Fosfatasa alcalina	472.66	159.48	313.18	500.07	153.23	350.049	5.93	<0.00001	0.00307

En las graficas 1 al 10 se presenta la comparación de cada una de las determinaciones con los reactivos de marca Merck® y DCL®, y se presentan los valores de "t", valor de "p" y coeficiente de correlación de concordancia.

1. **Bilirrubina directa:** Datos obtenidos al comparar los reactivos de Merck® y DCL®.
 $n = 30$. El valor de la prueba de "t" es de 0.338, el valor de "p" es de 0.7378 y el coeficiente de correlación de concordancia es de 0.9292,

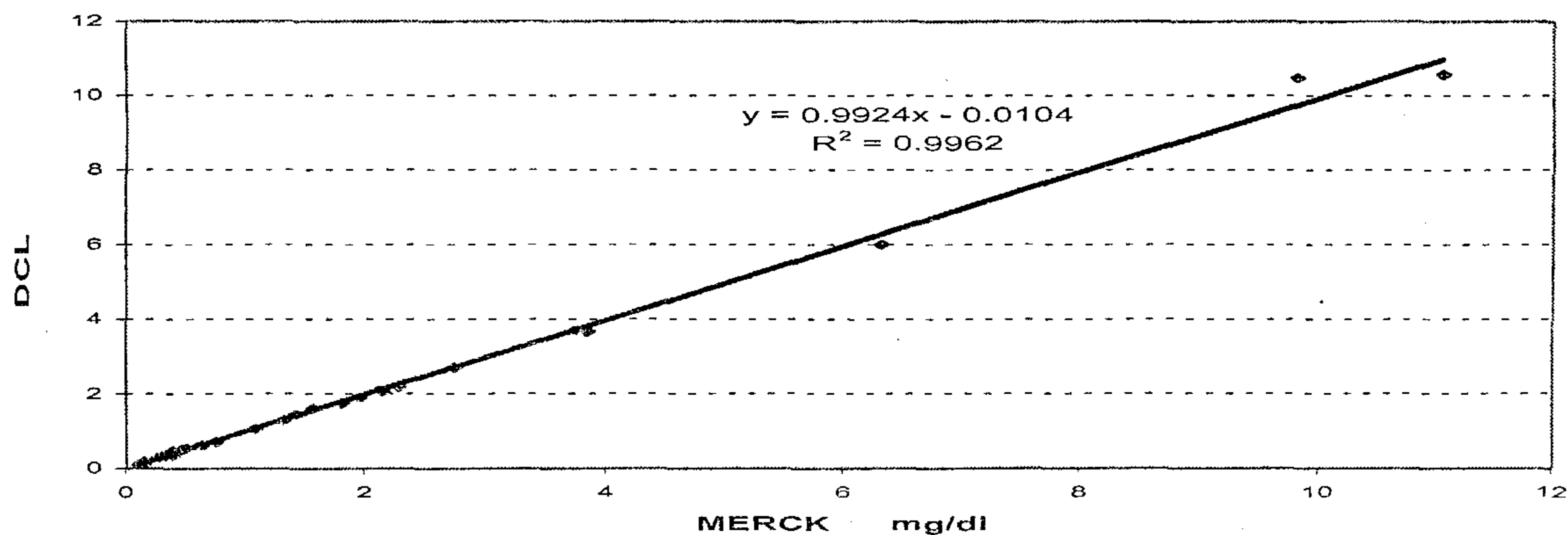
Gráfica 1. Comparación de reactivos para BILIRRUBINA DIRECTA, Merck y DCL



Fuente: datos experimentales

2. **Bilirrubina total:** En la gráfica 2 se observan los resultados de la bilirrubina total. $n = 33$.
 El valor de "t" es de 0.714, el valor de "p" es de 0.4804 y el coeficiente de correlación de concordancia es de 0.9698.

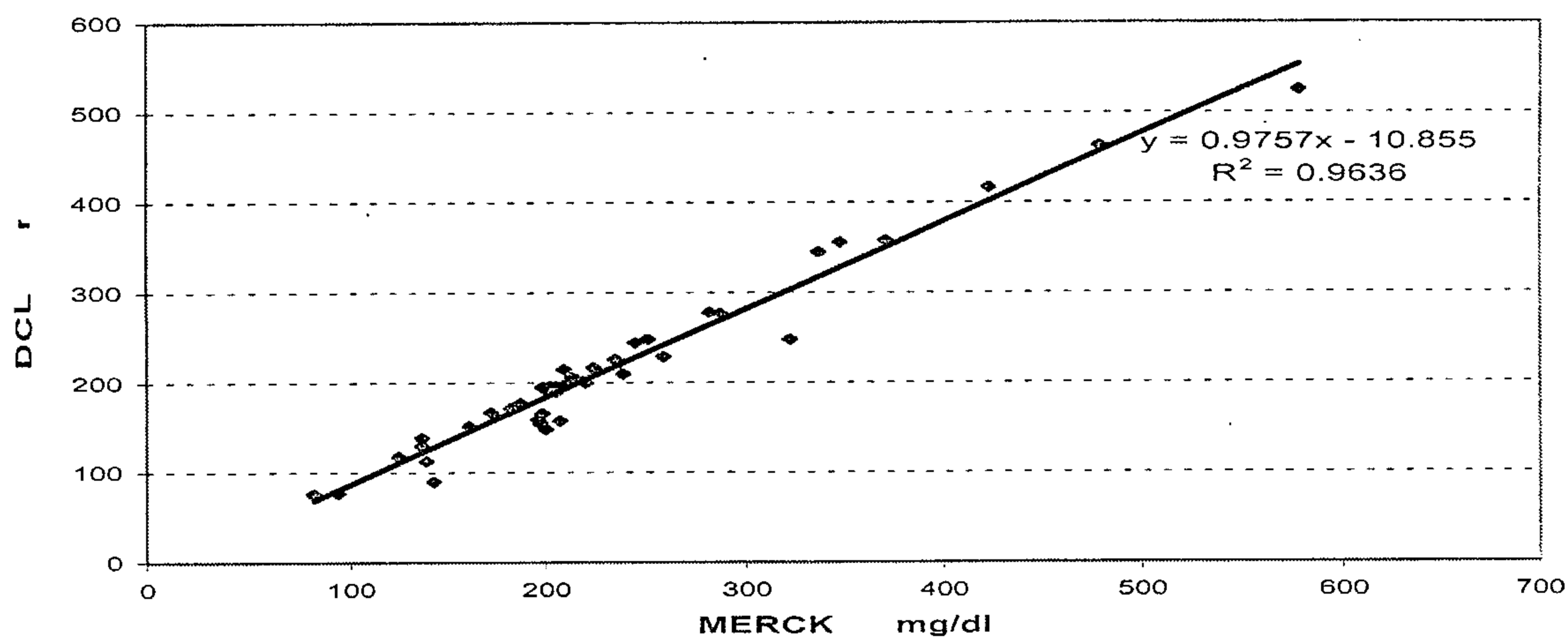
Gráfica 2. Comparación de reactivos para BILIRRUBINA TOTAL, Merck y DCL



Fuente: datos experimentales

3. **Colesterol Total:** En la gráfica 3 se encuentran los resultados del colesterol, $n = 45$, con un valor en la prueba de "t" de 6.145, valor de "p" < 0.00001 y con un coeficiente de correlación de concordancia de 0.3697.

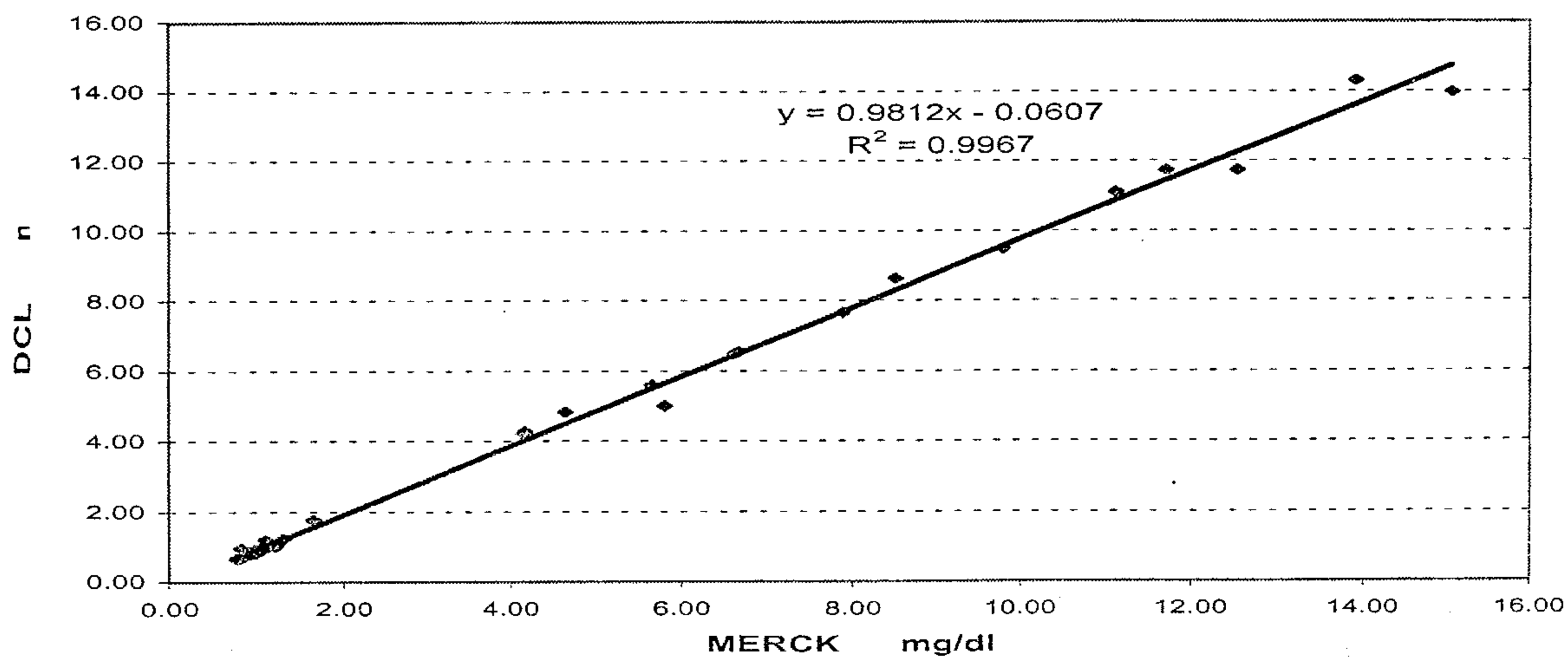
Gráfica 3. Comparación de reactivos para COLESTEROL, Merck y DCL



Fuente: datos experimentales

4. **Creatinina:** En la gráfica 4 se representan los resultados de la creatinina, $n = 45$, en el análisis de las muestras, el valor de "t" es de 3.611, el valor de "p" es de 0.0008 y el coeficiente de correlación de 0.9686.

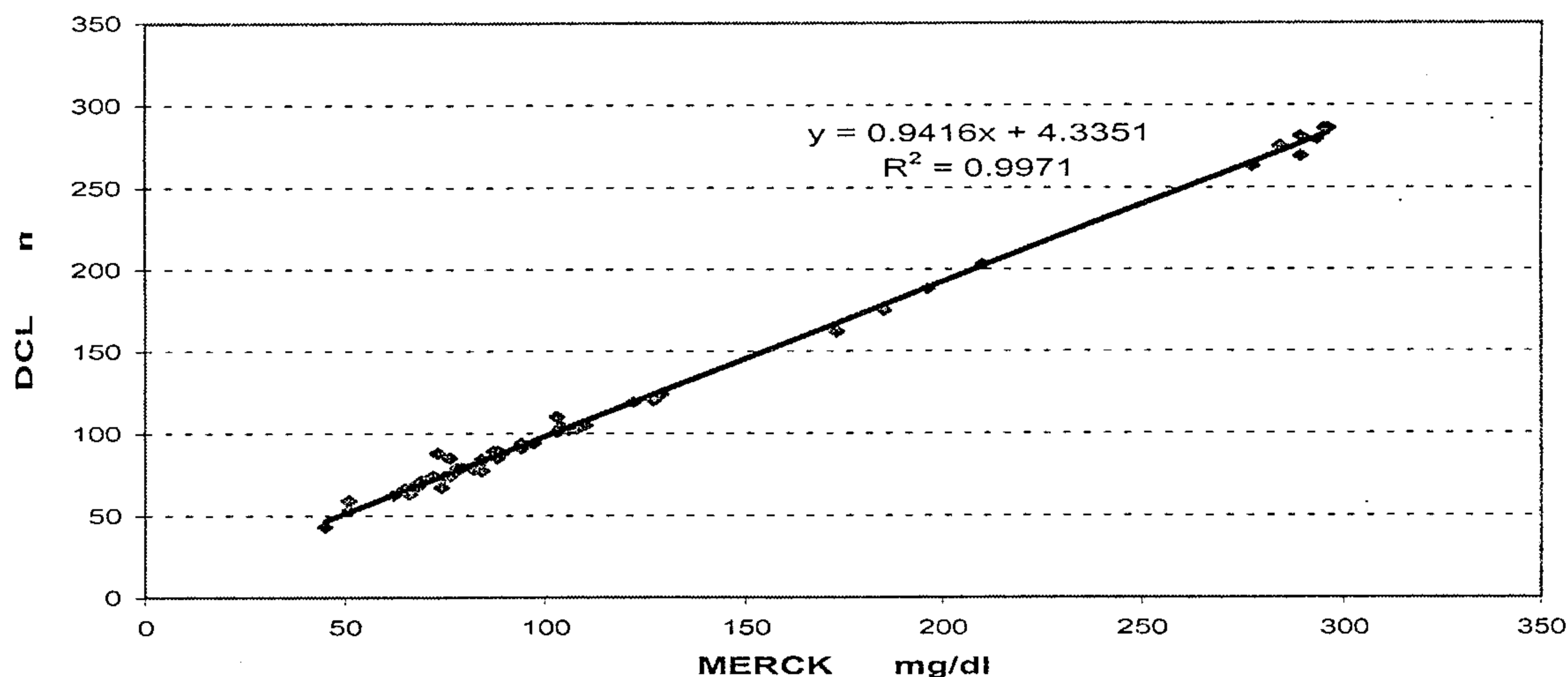
Gráfica 4. Comparación de reactivos para CREATININA, Merck y DCL



Fuente: datos experimentales

5. **Glucosa:** En la gráfica 5 se presentan los resultados de la glucosa, $n = 53$, el valor "t" es 3.504, el valor "p" es 0.001 y el coeficiente de correlación de concordancia 0.9096.

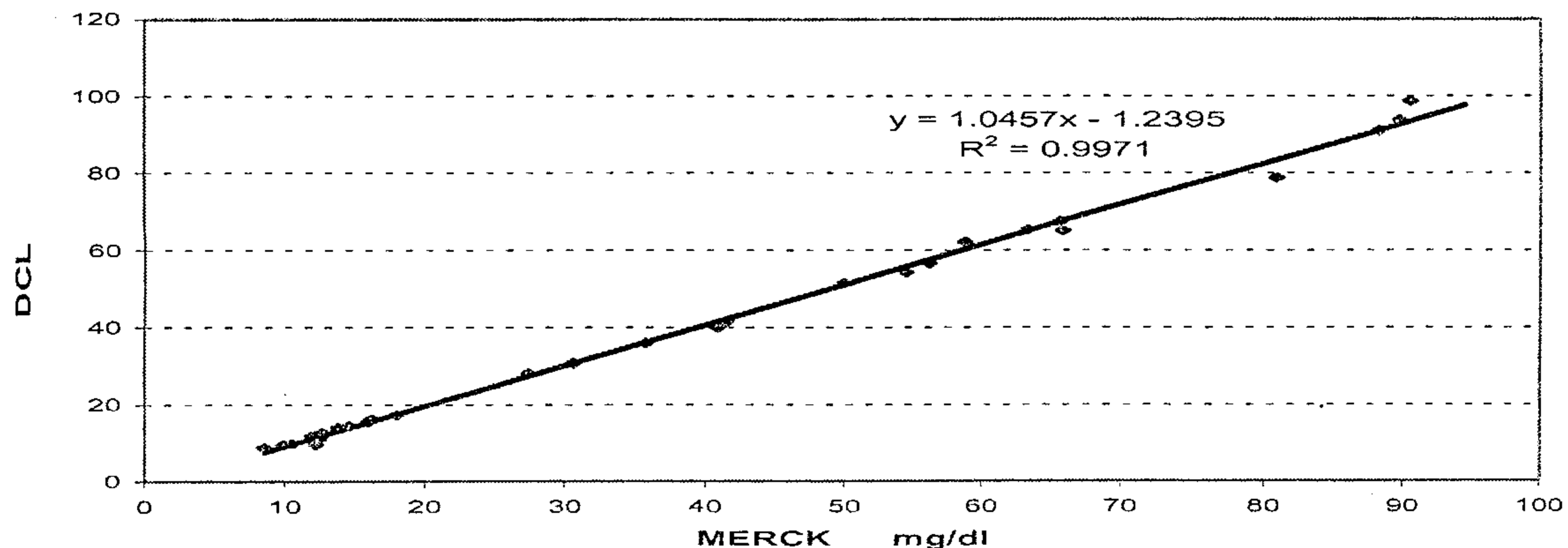
Gráfica 5. Comparación de reactivos para GLUCOSA, Merck y DCL



Fuente: datos experimentales

6. **Nitrógeno de urea:** En la gráfica 6 se representan los datos del nitrógeno de urea, $n = 31$, el valor de "t" es 1.194, valor de "p" es 0.2418 y el coeficiente de correlación de concordancia es 0.9625.

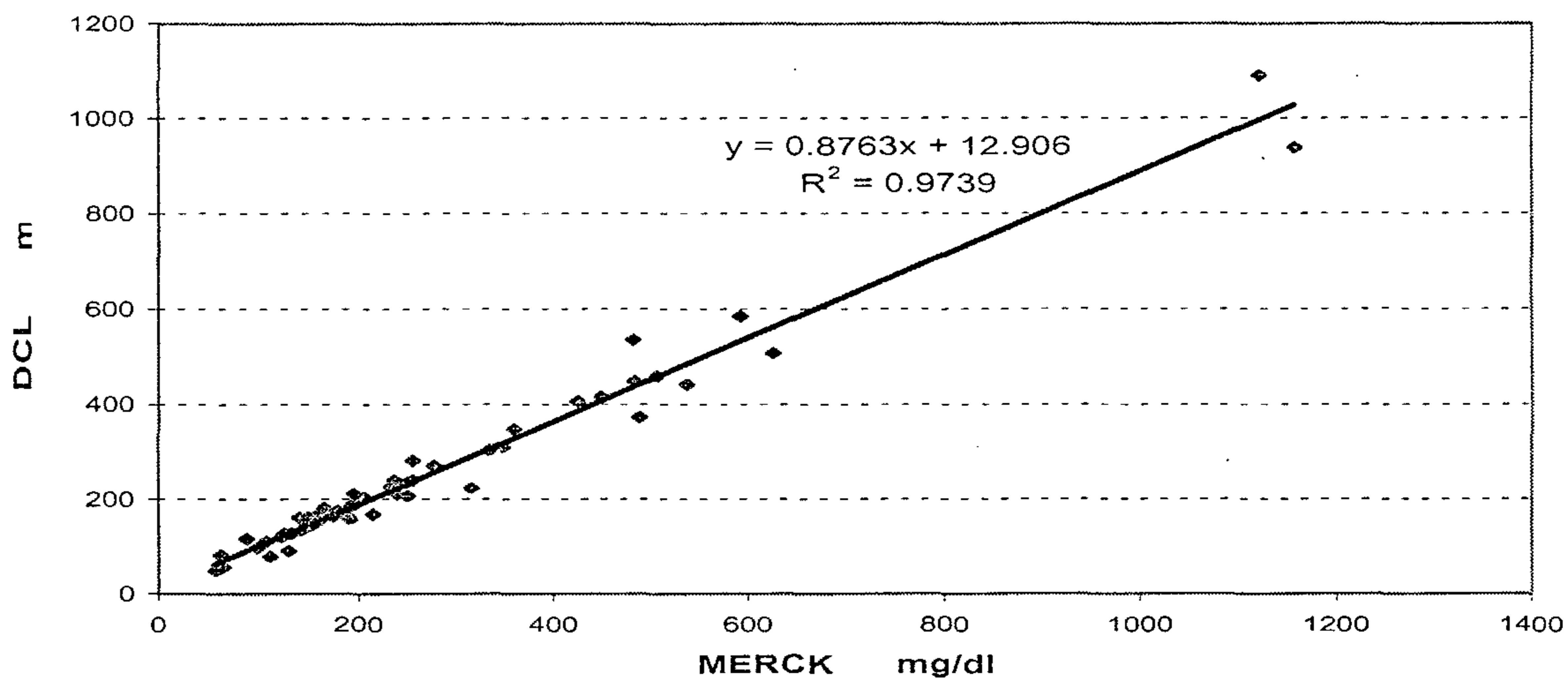
Gráfica 6. Comparación de reactivos para NITROGENO DE UREA, Merck y DCL



Fuente: datos experimentales

7. **Triglicéridos:** En la gráfica 7 se representaron los datos de los triglicéridos, $n = 57$, el valor de "t" de 3.604, el valor de "p" es 0.0007 y el coeficiente de correlación de concordancia de 0.4658.

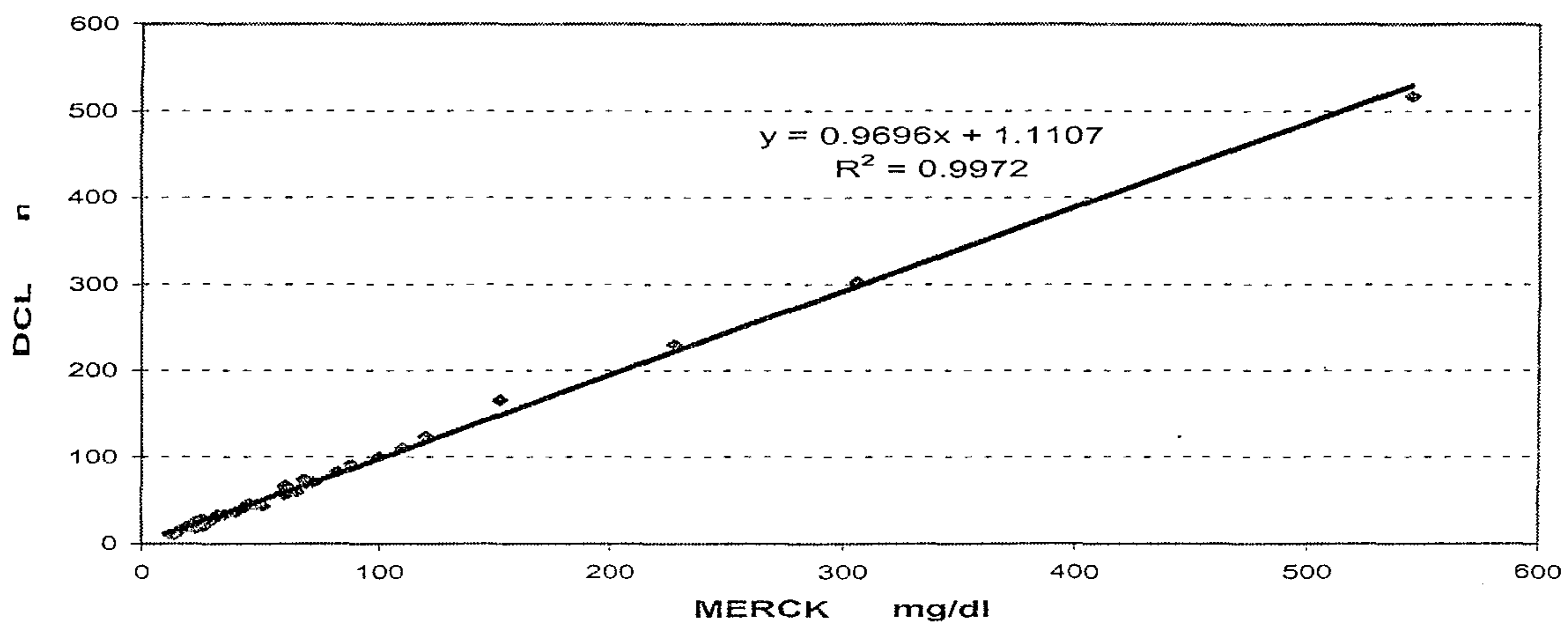
Gráfica 7. Comparación de reactivos para TRIGLICERIDOS, Merck y DCL



Fuente: datos experimentales

8. **Transaminasa glutámico oxalacética:** En la gráfica 8 se presentan los resultados de la transaminasa glutámico oxalacética, $n = 41$, el valor de "t" es 1.183, el valor de "p" es 0.2438 y el coeficiente de correlación de concordancia de 0.9649.

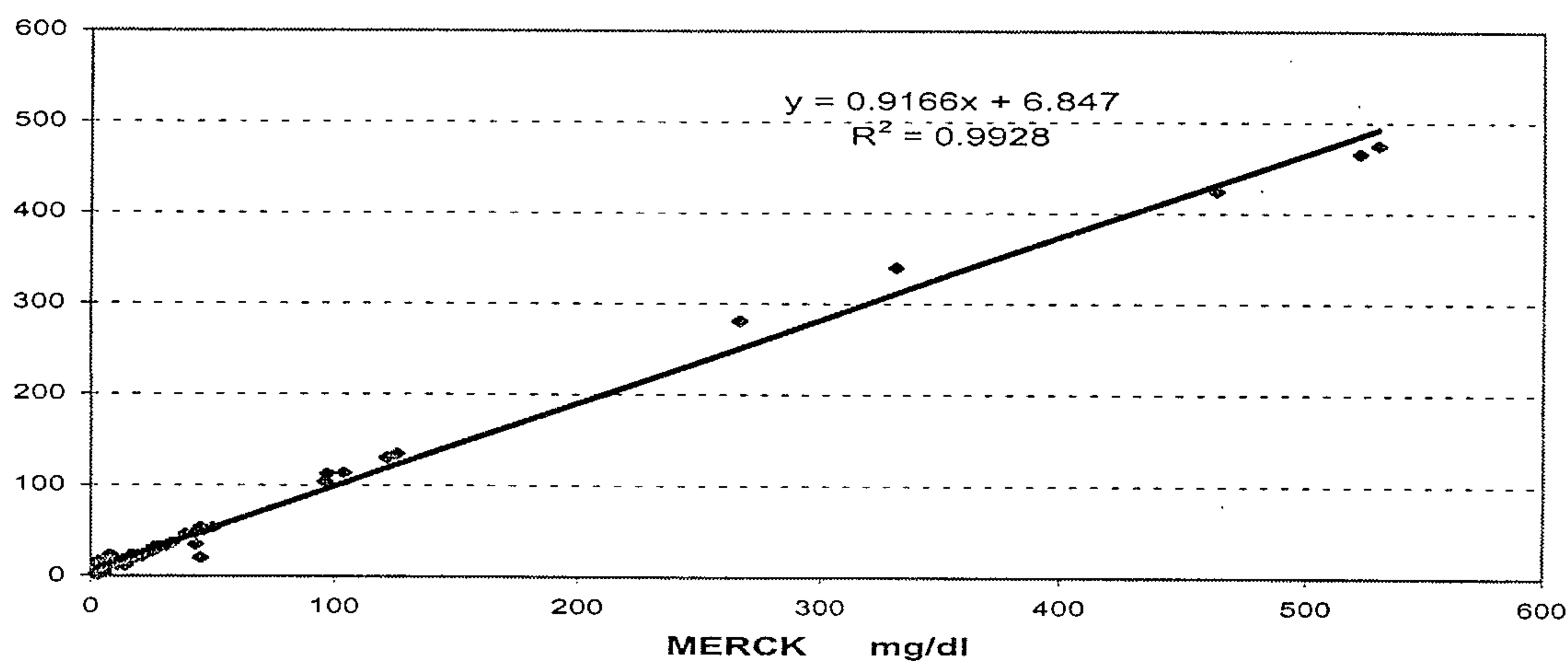
Gráfica 8. Comparación de reactivos para TRANSAMINASA GLUTAMICO OXALACETICA, Merck y DCL



Fuente: datos experimentales

9. **Transaminasa glutámico pirúvica:** En la gráfica 9 se muestran los resultados de la transaminasa glutámico pirúvica, $n = 53$, el valor de "t" es 0.601, el valor de "p" es 0.5505 y el coeficiente de correlación de concordancia de 0.9362.

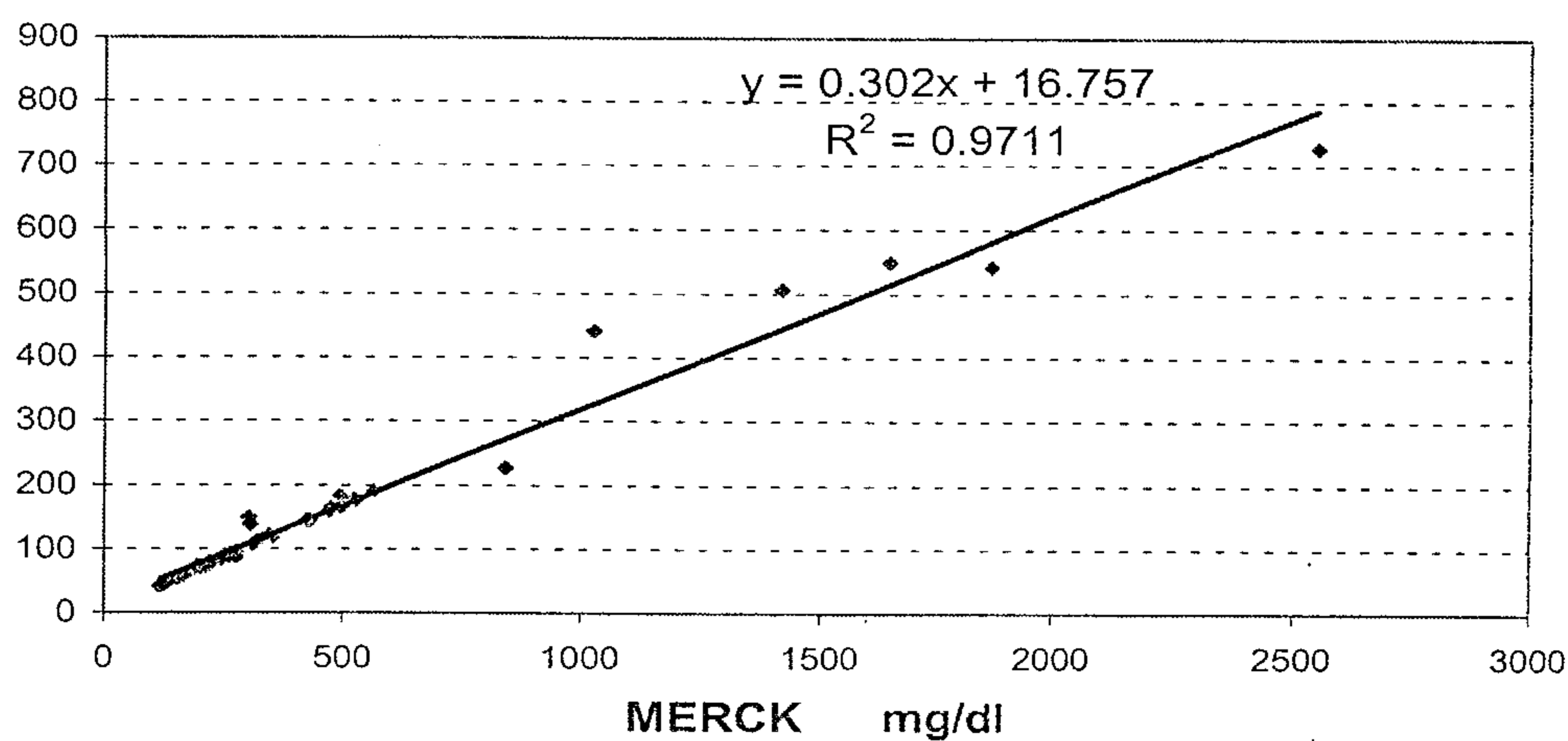
Gráfica 9. Comparación de reactivos para TRANSAMINASA GLUTAMICO PIRUVICA, Merck y DCL



Fuente: datos experimentales

10. **Fosfatasa alcalina:** En la gráfica 10 se encuentran los resultados de la fosfatasa alcalina, $n = 44$, con un valor de "t" de 5.93, un valor de "p" < 0.00001 y un coeficiente de correlación de concordancia de 0.00307.

Gráfica 10. Comparación de reactivos para FOSFATASA ALCALINA, Merck y DCL



Fuente: datos experimentales

IX. DISCUSION DE RESULTADOS

Después de realizar el análisis estadístico a cada uno de los analitos, se obtuvo que si existe igualdad y concordancia entre los reactivos de Merck® y DCL® en las siguientes pruebas: **bilirrubina directa, bilirrubina total, nitrógeno de urea, transaminasa glutámico oxalacética y transaminasa glutámico pirúvica**; lo que significa que los reactivos de Merck® y los reactivos de DCL® no tienen diferencias estadísticamente significativas y pueden ser utilizados con la misma confianza.

El valor de "p" encontrado fue de 0.7378 para la bilirrubina directa, 0.4804 para la bilirrubina total, 0.2418 para el nitrógeno de urea, 0.2438 para la para la transaminasa glutámico oxalacética, 0.5505 para la transaminasa glutámico pirúvica. Estos valores se encuentran arriba de 0.05, por lo que se acepta la hipótesis nula, que indica que los reactivos son iguales, es decir no hay variación significativa entre los datos obtenidos con cualquiera de ambos reactivos. El coeficiente de correlación de concordancia, tiene un valor de 0.9292 para la bilirrubina directa, para la bilirrubina total es 0.9698, para el nitrógeno de urea es de 0.9625, para la transaminasa glutámico oxalacética es de 0.9649, para la transaminasa glutámico pirúvica es de 0.9362, todos estos datos son mayores de 0.75, lo que refleja una muy buena a excelente correlación. Estos métodos tienen el mismo principio de reacción, se utiliza la misma cantidad de reactivo y la misma cantidad de muestra, las reacciones se leen a la misma longitud de onda, se usan los mismos reactivos.

No se encontró concordancia entre los analitos de **colesterol total, creatinina, glucosa, triglicéridos y fosfatasa alcalina**, de marca Merck® y DCL®, es decir que los reactivos de estos analitos son diferentes significativamente.

Para el colesterol total, el valor de "p" es <0.00001 y el coeficiente de correlación de concordancia es 0.3697, para los triglicéridos el valor de "p" es 0.0007 y el valor del coeficiente de correlación de concordancia es de 0.4658, lo que se interpreta como algún grado de correlación y para la fosfatasa alcalina el valor para "p" es <0.00001 y el valor del coeficiente de correlación de

concordancia es 0.00307, que indica correlación escasa o sin correlación. El valor de "p" mas bajo que 0.05, hace rechazar la hipótesis nula y aceptar la hipótesis alterna, lo que significa que los resultados obtenidos con estos reactivos son diferentes. Las pruebas de colesterol y triglicéridos, tienen el mismo principio químico, son los mismos reactivos, la fosfatasa alcalina no es el mismo principio, los reactivos de Merck® están producidos bajo las reglas de la DGKC y DCL®, bajo las reglas de la IFCC.

El valor de "p" para la creatinina es de 0.0008, y para la glucosa es de 0.001, éstos son valores menores a 0.05, lo que indica que los reactivos de marca Merck® y DCL® para estos analitos son diferentes significativamente. El coeficiente de correlación de concordancia para la glucosa es de 0.9096 y para la creatinina tiene un valor de 0.9686, se interpreta como una muy buena a excelente correlación de concordancia; al analizar los datos obtenidos, se observa que en los valores altos existe mucha discrepancia, la prueba de t demuestra la variabilidad que tienen los datos obtenidos con las muestras, y confirma que el método no es bueno, a pesar de que los valores del coeficiente de correlación de concordancia son altos, esta dispersión de los valores indica que no existe similitud entre los métodos, porque pierden precisión en los valores elevados, entonces estadísticamente, no se pueden aceptar; es decir, tienen cierta relación, pero el valor numérico entre un reactivo y otro es diferente. En el caso de la glucosa, el reactivo de marca Merck® usa el principio GOD-PAP y el reactivo de marca DCL®, usa el principio de hexokinasa, es mas específico el principio de la hexokinasa. La creatinina tiene el mismo principio en ambas marcas de reactivos, pero la reacción de Jaffé es poco estable y pueden existir muchas interferencias.

X. CONCLUSIONES

1. Al comparar los reactivos de marca Merck® con los reactivos de marca DCL® para las pruebas de bilirrubina directa, bilirrubina total, nitrógeno de urea, transaminasa glutámico oxalacética y transaminasa glutámico pirúvica, se observó que en estos reactivos no existe diferencia estadísticamente significativa.
2. Las pruebas de colesterol total, triglicéridos y fosfatasa alcalina de marca Merck® y DCL® son diferentes significativamente.
3. Los reactivos para la creatinina y para la glucosa de marca Merck® y DCL®, son diferentes significativamente, pero si presentan cierto grado de concordancia, es decir, si tienen cierta relación, pero el valor numérico entre una marca y otra es diferente. Con la prueba de "t" se demostró la variabilidad que existe entre los reactivos, que indica la falta de precisión.
4. Se observó en todas las pruebas realizadas que cuando estos se encuentran dentro de los rangos normales de referencia, hay menos variación y menos dispersión en los datos obtenidos.
5. En los analitos que se compararon se notó una mayor variación y dispersión de los datos, cuando éstos se encontraban dentro de los rangos de valores patológicos.
6. Al hacer una comparación de métodos, es necesario verificar que las metodologías utilizadas por ambas marcas tengan el mismo principio químico.
7. Se realizó una guía práctica para la comparación analítica de reactivos de Química Clínica.

XI. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda a todos los Laboratorios Clínicos realizar estudios comparativos de reactivos, antes de comprar y/o cambiar métodos en el área de Química Clínica, con reactivos conocidos de buena calidad que se puedan utilizar como métodos de comparación, para poder tener la seguridad de reportar datos exactos al paciente.
2. Se recomienda que al realizar estudios comparativos, sean tomados en cuenta la precisión y exactitud de los métodos, principios químicos, linealidad, estabilidad de los reactivos, preparación de los reactivos, equipo disponible y costo del reactivo.
3. Para reducir los costos en un Laboratorio Clínico, pueden utilizarse reactivos de la marca DCL® para los analitos de bilirrubina directa, bilirrubina total, nitrógeno de urea, transaminasa glutámico oxalacética y transaminasa glutámico pirúvica, tomando siempre en cuenta las características del fabricante de la fecha de vida útil del reactivo.
4. En un Laboratorio Clínico se deben estudiar los insertos de cada metodología a usar, antes de comprar los reactivos, y también al momento de cambiar las metodologías ya sea por costos, por tecnología o por equipo, para que siempre se den resultados que reflejen el verdadero valor que corresponde al paciente y contribuir al diagnóstico con el objetivo de lograr su mejoría.
5. Se recomienda la utilización de la Guía Práctica propuesta en el presente trabajo de tesis, a fin de que los laboratorios puedan realizar fácilmente la comparación entre dos marcas de reactivos, cuando tengan el propósito de sustituir una marca conocida por otra que les ofrezca un costo menor o un procedimiento mas accesible para su trabajo de análisis químico.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Kaplan L. A., Pesce A. J. Clinical Chemistry; Theory, analysis and correlation. 2nd. Edition. USA. Mosby. 1989. 1149 p.
2. Boquet E., *et. al.* Mejoría continúa de la calidad; guía para los laboratorios clínicos de América latina. 1ra. Edición. México, Editorial Médica Panamericana. 1995. 314 p.
3. Linch's. Medical Laboratory Technology. 3 Edition. Saunders. USA. 1976. 874 p.
4. McClatchey. K. Clinical Laboratory Medicine. Philadelphia. Lippincott William & Wilkins. 2002. XVI t. 1693p.
5. Artiss J., *et.al.* Cost analysis for instrument selection. Clin Chem. 1995. 34(2):32-38.
6. Berte L., *et.al.* Training verification for lab personnel: A new guide. Clin Chem. 1995. 34(1):38-42.
7. Persoon T., *et.al.* Introducing new technology into the clinical laboratory. Clin Chem. 1995. 34(7):32-36.
8. Roseman E., Reengineering the laboratory. Clin Chem. 1995. 34(5):36-38.
9. Gies B. A step-by-step approach to implementing change. Clin Chem. 1994. 33(10):54-56.
10. Dawson-saunders B., Trapp R. G. Bioestadística Médica. Editorial El Manual Moderno. México. 1993. 380p.
11. Nickerson C. A note on "A Concordance Correlation Coefficient to Evaluate Reproducibility". Biometrics. 1997. 53(4):1503-1507.
12. Dávila- Esqueda M., *et. al.* Comparación de las determinaciones de glucosa en sangre por química seca y química húmeda: su influencia en la toma de decisiones terapéuticas. Bioquímica. 2000. 25(3):75-78.
13. Hernández T. A., *et. al.* Estudio comparativo entre los métodos directo y por precipitación para la determinación del colesterol HDL. Bioquímica. 1998. 23(3):882-886.

14. Cham B., *et. al.* Correlations between cholesterol, vitamin E, and vitamin K1 in serum: paradoxical relationships to established epidemiological risk factors for cardiovascular disease. *Clin Chem.* 1998. 44(8):1753-1755.
15. Rifai N., *et.al.* Assessment of interlaboratory performance in external proficiency testing programs with a direct HDL-cholesterol assay. *Clin Chem.* 1998. 44:7; 1452-1458.
16. Davelaar E., *et.al.* Comparison of seven immunoassays for the quantification of CA 125 antigen in serum. *Clin Chem.* 1998. 44:7; 1417-1422.
17. Cole D., *et.al.* Correlation between total homocysteine and cyclosporine concentrations in cardiac transplant recipients. *Clin Chem.* 1998. 44:11; 2307-2312.
18. Weitgasser R., *et.al.* Newer portable glucose meters-analytical improvement compared with previous generation devices?. *Clin Chem.* 1999. 45:10; 1821-1825.
19. Viitala K., *et.al.* Comparison of the axis %CDT TIA and the CDTest meted as laboratory tests of alcohol abuse. *Clin Chem.* 1998. 44:6; 1209 - 1215.
20. Cao G., *et.al.* Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin Chem.* 1998. 44:6; 1309-1315.
21. Stickle D., *et.al.* Correlation of plasma concentrations of cystatin C and cretinine to inulin clearance in a pediatric population. *Clin Chem.* 1998. 44:6; 1334-1338.
22. Arranz M. L., *et. al.* Comparison of two homogeneous assays with a precipitation meted and an ultracentrifugation meted for the measurement of HDL-cholesterol. *Clin Chem.* 1998. 44:12; 2499-2505.
23. Gion M., *et.al.* Comparison of the diagnostic accuracy of CA27.29 and CA15.3 in primary breast cancer. *Clin Chem.* 1999. 45:5; 630-637.
24. Manual Merck® Vitalab Selectra 2. 1995. Merck®, Alemania. 256p.
25. Manual de Técnicas: Directions for use Clinical Chemistry. Merck®, Alemania. 1999.
26. Manual de Técnicas. Diagnostic Chemicals Limited. DCL®. Canadá. 1999.
27. www.merck.com consultado 28/06/2001.
28. www.dcl.com consultado 28/06/2001.

XIII. ANEXOS

TABLAS COMPARATIVAS ENTRE LOS REACTIVOS DE Merck® Y DCL®

Anexo 1

Características del método de BILIRRUBINA DIRECTA (25,26)

Características del método	Merck®	DCL®
Código	B1A01372	202-S7
Presentación	1 x 125 mL	2 x 125 mL
Principio de reacción	Acido sulfanílico diazo	Acido sulfanílico diazo
Reactivo listo para usar	Si	Si
Estabilidad del reactivo utilizado a 2 - 8 °C	Reactivos sin mezclar hasta fecha de expiración, solución reactiva 3 días	Reactivos sin mezclar hasta fecha de expiración, solución reactiva 3 días
Volumen de reactivo	1,000 uL solución 2 1 gota solución 3	400 uL reactivo 1 100 uL reactivo 2
Volumen de muestra	50 uL	25 uL
Longitud de onda	555 nm	555 nm
Linealidad	20 mg/dL	20 mg/dL
Valores de referencia	0.0 - 0.2 mg/dL	Adultos:0.0-0.2mg/dL Recién nacidos: mg/dL Hasta 24 horas:2 - 6 hasta 48 horas:6 - 10 de 3 - 5 días: 4 - 8

Anexo 2

Características del método de BILIRRUBINA TOTAL (25,26)

Características del método	Merck®	DCL®
Código	B1A01372	204-S7
Presentación	1 x 125 mL	2 x 125 mL
Principio de reacción	Acido sulfanílico diazo	Acido sulfanílico diazo
Reactivo listo para usar	Si	Si
Estabilidad del reactivo utilizado a 2 - 8 °C	Reactivos sin mezclar hasta fecha de expiración, solución reactiva 3 días	Reactivos sin mezclar hasta fecha de expiración, solución reactiva 3 días
Volumen de reactivo	1,000 uL solución 1 1 gota solución 3	500 uL reactivo 1 100 uL reactivo 2
Volumen de muestra	50 uL	15 uL
Longitud de onda	555 nm	555 nm
Linealidad	20 mg/dL	20 mg/dL
Valores de referencia	0.2 - 1.0 mg/dL	Adultos:0.2-1.0mg/dL

Anexo 3

Características del método de COLESTEROL TOTAL (25,26)

Características del método	Merck®	DCL®
Código	1.14830.0001	234-60
Presentación	12 x 25 mL	2 x 100 mL
Principio de reacción	CHOD-PAP	CHOD-PAP
Reactivo listo para usar	Si	Si
Estabilidad del reactivo utilizado a 2 - 8 °C	Hasta fecha de expiración	Hasta la fecha de expiración
Volumen de reactivo	500 uL	500 uL
Volumen de muestra	5 uL	5 uL
Longitud de onda	500 nm	505 nm
Linealidad	500 mg/dL	600 mg/dL
Valores de referencia	140 - 220 mg/dL	< 200 mg/dL

Anexo 4

Características del método de CREATININA (25,26)

Características del método	Merck®	DCL®
Código	1.03385.0001	221-30
Presentación	2 x 85 mL	2 x 100 mL
Principio de reacción	Jaffé	Jaffé
Reactivo listo para usar	Si	Si
Estabilidad del reactivo utilizado a 2 - 8 °C	Reactivos sin mezclar hasta fecha de expiración, solución reactiva 3 días	Reactivos sin mezclar hasta fecha de expiración, solución reactiva 4 días
Volumen de reactivo	1,000 uL solución 1 1,000 uL solución 2	500 uL
Volumen de muestra	50 uL	25 uL
Longitud de onda	505 nm	505 nm
Linealidad	5 mg/dL	22 mg/dL
Valores de referencia	Mujeres: 0.6-0.9 mg/dL hombres: 0.7 - 1.1 mg/dL	0.5 - 1.2 mg/dL

Anexo 5

Características del método de GLUCOSA (25,26)

Características del método	Merck®	DCL®
Código	B1A02475	235-60
Presentación	2 x 250 mL	2 x 100 mL
Principio de reacción	GOD-PAP	Hexokinasa
Reactivo listo para usar	Si	Si
Estabilidad del reactivo utilizado a 2 - 8 °C	Hasta fecha de expiración	Hasta la fecha de expiración
Volumen de reactivo	500 uL	500 uL
Volumen de muestra	5 uL	5 uL
Longitud de onda	500 nm	340 nm
Linealidad	500 mg/dL	600 mg/dL
Valores de referencia	70 - 110 mg/dL	70 - 105 mg/dL

Anexo 6

Características del método de TRIGLICÉRIDOS (25,26)

Características del método	Merck®	DCL®
Código	1.14856.0001	236-60
Presentación	12 X 25 mL	2 x 100 mL
Principio de reacción	GPO-PAP	GPO-PAP
Reactivo listo para usar	Si	Si
Estabilidad del reactivo utilizado a 2 - 8 °C	Reactivo sin reconstituir hasta fecha de expiración, reactivo Reconstituido 8 semanas	Hasta la fecha de expiración
Volumen de reactivo	500 uL	500 uL
Volumen de muestra	5 uL	5 uL
Longitud de onda	500 nm	505 nm
Linealidad	1,000 mg/dL	1,000 mg/dL
Valores de referencia	Hasta 150 mg/dL	Mujeres: 35-135 mg/dL Hombres: 40 - 160 mg/dL

Anexo 7

Características del método de NITRÓGENO DE UREA (25,26)

Características del método	Merck®	DCL®
Código	B1A02374	239-10
Presentación	8 x 60 mL	1 x 100 mL
Principio de reacción	Ureasa UV	Ureasa UV
Reactivo listo para usar	No	No
Estabilidad del reactivo utilizado a 2 - 8 °C	Reactivos sin mezclar hasta fecha de expiración, solución reactiva 2 meses	Reactivos sin mezclar hasta fecha de expiración, solución reactiva 4 semanas
Volumen de reactivo	500 uL	500 uL
Volumen de muestra	5 uL	5 uL
Longitud de onda	340 nm	340 nm
Linealidad	140 mg/dL	130 mg/dL
Valores de referencia	7 - 18 mg/dL	11 - 37 mg/dL

Anexo 8

Características del método de TRANSAMINASA GLUTÁMICO OXALACETICA (TGO) (25,26)

Características del método	Merck®	DCL®
Código	1.14829.0001	319-10
Presentación	10 x 25 mL	1 x 100 mL
Principio de reacción	Oxalacetato, malato	Oxalacetato, malato
Reactivo listo para usar	No	No
Estabilidad del reactivo utilizado a 2 - 8 °C	Reactivos sin mezclar hasta fecha de expiración, solución reactiva 4 semanas	Reactivos sin mezclar hasta la fecha de expiración, solución reactiva 4 semanas
Volumen de reactivo	500 uL	500 uL
Volumen de muestra	50 uL	50 uL
Longitud de onda	340 nm	340 nm
Linealidad	240 U/L	600 U/L
Valores de referencia	Mujeres: 10 - 31 U/L hombres: 10 - 35 U/L	Adultos: 5 - 34 U/L Recién nacidos: 10 - 68 U/L

Anexo 9

Características del método de TRANSAMINASA GLUTÁMICO PIRUVICA (TGP) (25,26)

Características del método	Merck®	DCL®
Código	1.14820.0001	318-10
Presentación	10 x 25 mL	1 x 100 mL
Principio de reacción	Alanina, piruvato	Alanina, piruvato
Reactivo listo para usar	No	No
Estabilidad del reactivo utilizado a 2 - 8 °C	Reactivos sin mezclar hasta fecha de expiración, solución reactiva 4 semanas	Reactivos sin reconstituir hasta la fecha de expiración, solución reactiva 4 semanas
Volumen de reactivo	500 uL	500 uL
Volumen de muestra	50 uL	50 uL
Longitud de onda	340 nm	340 nm
Linealidad	220 U/L	600 U/L
Valores de referencia	Mujeres: 9 - 36 U/L hombres: 9 - 43 U/L	Adultos: 10 - 35 U/L Recién nacidos: 7 - 40 U/L

Anexo 10

Características del método de FOSFATASA ALCALINA (25,26)

Características del método	Merck®	DCL®
Código	1.14858.0001	309-10
Presentación	10 x 25 mL	1 x 100 mL
Principio de reacción	p-NPP (DGKC)	p-NPP (IFCC)
Reactivo listo para usar	No	No
Estabilidad del reactivo utilizado a 2 - 8 °C	Reactivos sin mezclar hasta fecha de expiración, solución reactiva 5 días	Reactivos sin mezclar hasta la fecha de expiración, solución reactiva 4 semanas
Volumen de reactivo	500 uL	500 uL
Volumen de muestra	10 uL	10 uL
Longitud de onda	405 nm	405 nm
Linealidad	700 U/L	2000 U/L
Valores de referencia	Mujeres:65-306 U/L hombres: 80 - 306 U/L menores de 15 años: hasta 645 U/L adolescentes < 17 años: hasta 483 U/L	Hasta 138 U/L

Anexo 11**Guía práctica para la comparación analítica de reactivos de Química Clínica****A. Identificación de las metodologías de trabajo de los reactivos a utilizar:**

1. Obtener información sobre el origen de los reactivos a estudiar.
2. Establecer cual será el método de comparación y cual será el método a comparar.
3. Analizar las metodologías: el principio de la reacción, presentación de los reactivos, preparación de los reactivos, temperatura de trabajo, volumen de muestra, volumen de reactivo, longitud de onda a la que se lee la reacción, cálculo de los resultados, linealidad, precisión y exactitud (1,3-9).

B. Recolección de muestras:

1. Establecer el número de muestras a estudiar y las condiciones que deben presentar los pacientes, según el analito que se desee analizar.
2. Extraer la muestra del paciente y seguir las normas de bioseguridad.

C. Procesamiento de las muestras:

1. Procesar las muestras bajo reglas de control de calidad.
2. Realizar procedimientos de control de calidad interna utilizando controles normales y patológicos, calibradores estableciendo las reglas de Westgard para aceptar una corrida y monitoreando la absorbancia de los reactivos.
3. Las muestras se deben procesar por ambos métodos el mismo día (1-4).
4. Si las muestras no se trabajan el mismo día, deben congelarse a 0°C hasta el momento de su procesamiento.

D. Diseño de la investigación:

1. Procesar una cantidad representativa de muestras tanto normales como patológicas, para que el estudio sea representativo, se deben analizar como mínimo 30 muestras para cada analito a estudiar.

E. Análisis de resultados:

- Las pruebas que pueden utilizarse para buscar una correlación entre los resultados están: el promedio de los datos, la desviación estándar, prueba de t para un diseño pareado con dos colas, probabilidad prueba de "p", y el coeficiente de correlación de concordancia.
- En el análisis de la prueba de "t" de student, si el valor de "t" calculado es mayor o igual que el valor de "t" crítico, entonces la hipótesis nula se rechaza, el valor de "t" crítico se toma de una tabla y depende del grado de libertad. Si el valor de "p" > 0.05 entonces se acepta la hipótesis nula, si p ≤ 0.05 entonces se rechaza la hipótesis nula. Para interpretar los coeficientes de correlación de concordancia se tomó el siguiente valor de referencia:

Correlaciones de 0 – 0.25 = correlación escasa o sin correlación.

Correlaciones de 0.25 – 0.50 = algún grado de correlación.

Correlaciones de 0.50 – 0.75 = moderada a buena.

Correlaciones > 0.75 = muy buena a excelente (10).

F. Formulas utilizadas para comparación de métodos:

1. Promedio:

$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$	Donde: x_i = una observación individual n = número de observaciones
--------------------------------	--

2. Desviación estándar:

$s^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$	Donde: $(x_i - \bar{x})$ = diferencia entre pares n = número de observaciones
--	--

3. Prueba de t:

$t = \frac{\bar{d}}{sd/n}$	Donde: \bar{d} = promedio de las diferencias sd = desviación estándar de las diferencias n = número de observaciones
----------------------------	--

4. Coeficiente de Correlación de Concordancia

$rc = \frac{s_1^2 + s_2^2 - s_{(1-2)}^2}{s_1^2 + s_2^2 + (y_1 - y_2)^2 - (s_{(1-2)}^2 / n)}$	Donde: s_1 = desviación estándar del reactivo de referencia s_2 = desviación estándar del reactivo en estudio $s_{(1-2)}$ = desviación estándar de las diferencias $y_1 - y_2$ = promedio de las diferencias n = número de observaciones
--	---