

23

Control de Calidad instrumental

En este capítulo se desarrollan diferentes métodos para controlar precisión y exactitud en las mediciones de los laboratorios de Análisis Clínicos. El concepto de *calidad* se toma en ese sentido. Un instrumento será de buena calidad cuando tenga una exactitud inferior a la menor unidad de su escala y una precisión acorde. Para *controlar* este hecho se usan modelos estadísticos relacionados con el concepto de *calibración*. Usando un patrón de la magnitud clínica que mide el instrumento, se realizan una serie de mediciones, y entonces el valor promedio de estas deberá coincidir con el valor del patrón para que sea *exacto*, mientras que su dispersión no deberá superar un valor prefijado como el *máximo admisible*. En los instrumentos, por lo general la precisión del equipo viene especificada por el fabricante. En otros casos, la experiencia clínica en mediciones es el parámetro por el cual se suele guiar al profesional, para especificar tal valor. El modelo Student para una sola muestra se emplea para estudiar o probar la coincidencia entre el valor medio medido y el esperado; o sea, controlar la exactitud del instrumento. El modelo de la Chi cuadrado prueba el desvío estándar de las mediciones contra el máximo aceptable, es decir, controla la precisión. Estos conceptos se ejemplifican a lo largo de este capítulo, con los instrumentos más comunes del laboratorio como pipetas, buretas, centrífugas, capilares, espectrofotómetros, estufas de cultivo, etc.

Algunos instrumentos requieren un solo punto de calibración, otros en cambio necesitan más puntos de control. Por razones didácticas, el primer caso se desarrolla en este capítulo pues el concepto básico es el mismo. El segundo, llamado la *recta de calibración*, donde se toman varios puntos, se explicó con más detalle en el Tema 21, correspondiente a la *Regresión Estadística*. A veces, se necesita comparar varios instrumentos entre sí, para decidir por el más *conveniente*. En este capítulo, se muestran las comparaciones de a pares, usando el modelo Student para dos muestras independientes, para contrastarlos en exactitud. El modelo F de Fisher se usa para comparar sus variaciones y testarlos en precisión. Cuando se necesita comparar de dos a la vez, se debe usar los modelos de ANOVA.

23.1 Introducción

El problema básico del control es determinar que se tendrá primero: si un patrón, para calibrar un sistema de medición, o un sistema calibrado para fabricar un patrón. Cada laboratorio en particular deberá contestarse esa pregunta de acuerdo a sus posibilidades. Por caso, si se dispone de una balanza de precisión bien calibrada, se puede preparar un control acuoso para calibrar una técnica de laboratorio. En cambio, si se disponen de pesas patrones, se puede calibrar la balanza primero para luego preparar el control. Una vez resuelto este problema, se procede a calibrar el instrumento sin olvidar al factor humano. En efecto, salvo que el instrumento sea total-

mente automatizado, es la dupla equipo-hombre el sistema de medición elemental y deben tomarse en cuenta ambos factores, como posibles fuentes de error. Por ejemplo, un error de tipo sistemático como atraso al medir tiempos, sobrepeso en una balanza, etc. se debe al instrumento; pero un error de paralaje, cuando el observador no se coloca bien enfrente de la escala de lectura, o no pone a cero una serie de pesadas, ya es cuestión del hombre. En cada uno de los dos factores se pueden producir desviaciones que alteren significativamente los resultados finales de la medición. Por lo tanto, es necesario diseñar controles para poder detectar tales desviaciones por separado, lo mismo que para todo el conjunto. La ventaja principal es que, detectando por separado las fluctuaciones, se facilita la tarea de corregir los defectos de tipo sistemático. Pero, siempre existirá una fuente de variación imposible de anular debido al azar (errores casuales), que deberá ser por lo menos acotada numéricamente.

Una vez calibrados los instrumentos, el paso siguiente es calibrar las técnicas de laboratorio, una por una, cosa que se verá en el capítulo siguiente. El tercer paso es mantener fiable a lo largo del tiempo el sistema de medición para asegurar los valores que se informan con el mismo, esto es, el "producto final" del laboratorio. El método usual para controlar regularmente una técnica de laboratorio es la denominada: *Carta de control de calidad*. Esto se verá en el Tema 25 de control estadístico de calidad.

En resumen, se calibran los instrumentos y luego se calibra el sistema por primera vez, luego, con la carta, se controla que se mantenga calibrado y cuando surge algún problema se vuelve al principio. Esto es, a recalibrar todo de nuevo. La estadística avisa de los problemas y valida las calibraciones, pero no explica como solucionar el problema. Esto se debe buscar en el conocimiento profesional del bioquímico o farmacéutico actuante, de su experiencia en control de calidad y en calibración de instrumentos.

23.2 Propagación de errores

De acuerdo a la *Hipótesis de Haegen-Bessel*, el error total casual de una medición cualquiera se debe a una multitud de causas aleatorias e independientes, unas de otras, que por sí mismas tienen una influencia infinitésima, pero tal que, la suma de todas ellas tiene una magnitud apreciable. Si a cada causa se la considera una variable independiente y aleatoria, en condiciones muy generales, el *Teorema Central del Límite*, establece que: la sumatoria de todas ellas es otra variable aleatoria; tipificando, esa suma se tendrá una distribución asintóticamente gaussiana. Así, se justifica el empleo del modelo de Gauss para los errores casuales en teoría de mediciones. En los capítulos de muestreo y de estimación estadística, se encuentra la manera de plantear el intervalo de confianza para una serie de mediciones del tipo.

$$\mu \in (\bar{x} \pm \Delta x)$$

Donde se expresa que el verdadero valor μ , de una magnitud x , pertenece a un intervalo formado por su mejor estimación puntual \bar{x} más (o menos) el error de medición Δx . En el modelo de Gauss, Δx es el producto del valor crítico de confianza Z_α por el error típico σ / \sqrt{n} de estimación. En el modelo Student, los cambios son: (a) Usar el valor medido muestral DS en lugar

del valor desconocido poblacional σ y (b) Usar el valor crítico $t_{\alpha; n-1}$ en vez de Z_{α} . Cuando no se tenga más de una medición, entonces Δx será directamente el error de estimación (la menor unidad de la escala de lectura, o su mitad en el caso de escala continua).

Antes de seguir con el tema de las calibraciones, se hace necesario introducir un nuevo concepto a la teoría de errores gaussianas, presentada en el Tema 2. Se trata de cómo se propagan los errores cuando hay más de una variable en juego, en el cómputo del error total.

Sea una magnitud cualquiera $Y = F(x_i)$; donde F es una función de n magnitudes clínicas o variables x_1, x_2, \dots, x_n . Si se mide cada una de las n magnitudes se obtienen:

$$\mu_x \in (\bar{x}_i \pm \Delta x_i)$$

donde:

μ : es el valor verdadero de la magnitud clínica medida x_i

\bar{x}_i : es el promedio de las mediciones efectuadas.

Δx_i : es el error de medición para un cierto nivel de significación α .

Una vez efectuadas todas las mediciones se trata de calcular el valor final:

$$\mu_Y \in (\bar{y} \pm \Delta y)$$

donde:

μ_Y : es el valor verdadero de la magnitud clínica buscada Y .

\bar{y} : es el promedio calculado con la fórmula $Y = F(x_i)$, o sea: $\bar{y} = F(\bar{x}_i)$.

Δy : es el error propagado por las x_i , para un cierto nivel de significación.

Con

$$(\Delta y)^2 = \sum_1^n \left[\left(\frac{\partial y}{\partial x_i} \right) \Delta x_i \right]^2$$

Es decir, el valor del error total al cuadrado, es igual a la sumatoria de los cuadrados del producto entre la derivada parcial de la función respecto a cada variable, y el error de la misma.

Ejemplo 1) En la fabricación de un patrón acuoso de glucosa, se pesó varias veces una cantidad de glucosa pura, estimada con una confianza del 95% en $(98,4 \pm 0,4)$ g y una cantidad de agua tridestilada estimada al 95% en $(92,5 \pm 0,3)$ dl. Calcular la concentración de la sustancia cuando ambas se mezclan. La relación entre ambas magnitudes es:

$$Y = \text{Masa de glucosa} / \text{Volumen de agua} = x_1 / x_2 = M / V$$

Cuyo valor promedio se calcula con:

$$\bar{y} = 98,4 \text{ g} / 92,5 \text{ dl} = 1,06378 \text{ g} / \text{dl}$$

El error total que afecta a la concentración es:

$$(\Delta y)^2 = \sum_1^n \left[\left(\frac{\partial Y}{\partial x_i} \right) \Delta x_i \right]^2 = \left(\frac{\Delta M}{V} \right)^2 + \left(\frac{M \cdot \Delta V}{V^2} \right)^2 = (4,32 \cdot 10^{-3})^2 + (3,45 \cdot 10^{-3})^2 = 30,565 \cdot 10^{-6}$$

Luego es: $\Delta y = 5,53 \cdot 10^{-3} \approx 6 \cdot 10^{-3}$

Finalmente, el resultado se expresa como:

$$\mu_Y \in (\bar{y} \pm \Delta y) = (1,064 \pm 0,006) \text{ g/dl} \rightarrow 95 \% \text{ CI } (1,052 ; 1,076)$$

Para un 95% de confianza, al error hay que multiplicarlo por 1,96 y calcular el intervalo anterior. Entonces la solución acuosa de glucosa estimada está entre 1,052 y 1,076 g / dl, la cual se puede usar como patrón acuoso.

23.3 Calibraciones de instrumentos

Hay muchos instrumentos diferentes en un laboratorio; aquí solo se mostrarán algunos de ellos en términos generales, con el objeto de ejemplificar el uso de las técnicas estadísticas empleadas en la calibración. Para comenzar conviene hacer una reflexión: Un buen instrumento para las calibraciones es aquel cuyo error de apreciación es muy pequeño, respecto a la de los otros instrumentos que se emplean en la técnica clínica. Por ejemplo, la recomposición de sueros liofilizado y otro tipo de diluciones se hacen usualmente con pipetas, una pipeta calibrada común de 1 a 10 ml, llega a tener un error de apreciación mínimo de una décima de ml, mientras que las comunes llegan a 0,5 ml. Ahora bien, si se usa una balanza eléctrica de precisión que tiene un error de 0,0001 g en su escala de lectura, entonces resulta más conveniente usar la balanza para medir la cantidad de agua necesaria que la pipeta. Parece natural comenzar por ahí.

23.3.1 Calibración de balanzas

Para poder calibrar una balanza se necesita un juego de pesas patrones con certificación del INTI (Instituto Nacional de Tecnología Industrial). La idea general es cubrir todo el rango de pesadas usuales en el laboratorio para testear una serie de puntos de su escala, que llega hasta los 200 g. Así, se traza una recta de calibración, comparando los valores promedios obtenidos, contra los valores patrones indicados en cada pesada como se vio en el Tema 22. Basta por ahora, tomar un solo punto, el del valor más usual en la recomposición de liofilizados. Sea por ejemplo, usar la pesa patrón de 2g para ello. El procedimiento es como sigue:

Paso 1) Nivelar la balanza, girando los tornillos de regulación en los pies de apoyo, hasta centrar la burbuja de aire en el indicador de nivel de vidrio. Conviene aislarla de vibraciones, apoyando sobre telgopor, cartón corrugado etc.

Paso 2) Colgar el platillo en su gancho, cerrar las tapas de vidrio laterales y trabar la balanza

Paso 3) Luego de encender la balanza se controla el ajuste de cero

Paso 4) Se coloca la pesa de 2 g con cuidado sobre el platillo y con las tapas cerradas se hace la primera pesada gruesa con la balanza semi destrabada. Luego se la destraba totalmente y se hace la pesada fina con el avance micrométrico hasta tener el valor final de la primera pesada

Paso 5) Se traba la balanza volviendo a cero los indicadores y se apaga. Se enciende nuevamente repitiendo los pasos anteriores hasta obtener el segundo valor. Y así sucesivamente por lo menos cinco veces. Ahora se tienen 5 pesadas repetidas de la pesa patrón.

Paso 6) Con los $n = 5$ valores obtenidos se calculan el promedio y el desvío estándar de las pesadas efectuadas con la balanza.

Paso 7) Se realiza el test estadístico para validar *exactitud*, usando el modelo Student

$H_0 : \mu = 2 \text{ g}$ Y la balanza tiene buena exactitud, está calibrada.

$H_1 : \mu \neq 2 \text{ g}$ La balanza tiene un error de tipo sistemático.

Se calcula :
$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{DS / \sqrt{n}} \quad \text{versus} \quad t_{\alpha, v}$$

Cuando el estadígrafo hallado t , sea menor que el crítico de tablas $t_{\alpha, v}$, se acepta la hipótesis nula; en cambio, si la situación es al revés se tiene evidencia significativa de descalibración. Lo mismo puede hacerse con otras pesas y seguir controlando puntualmente. En este caso de mediciones repetidas de la misma magnitud, se verifican los supuestos básicos de este modelo: por lo tanto, no se necesita recurrir al modelo no paramétrico equivalente, como el de la U de Mann-Whitney.

Una vez controlada la exactitud se procede con la precisión. Se fija un error relativo aceptable para este instrumento, por ejemplo no debe superar el 1%. De acuerdo a eso:

Paso 8) Se calcula el desvío estándar máximo admisible $DS_{adm.} = 0,01 \cdot 2\text{g} = 0,02\text{g}$

Paso 9) Se testea la hipótesis con el modelo de la Chi-cuadrado:

$H_0 : \sigma_{adm} \leq 0,02 \text{ g}$ Y la balanza tiene una precisión aceptable.

$H_1 : \sigma_{adm} > 0,02 \text{ g}$ Hay mucha dispersión.

Se calcula :
$$\chi^2 = (n-1) DS^2 / \sigma^2 \quad \text{versus} \quad \chi_{\alpha; v-1}$$

Si no se rechazan ambas hipótesis nulas, entonces se puede pensar que la balanza tiene una exactitud y precisión aceptables para el control de la calidad propuesto. O sea: *La balanza esta bien calibrada.*

23.3.2 Calibración de pipetas

Para poder calibrar una pipeta, se usa una balanza eléctrica bien calibrada y agua tridestilada. La idea es cargar con agua una pipeta cualquiera y luego pesar el agua recogida en una balanza, para verificar si el volumen de agua coincide con su peso. De esta manera, se puede realizar varios tipos de controles como:

- Control de precisión y exactitud de una pipeta.
- Verificar lo mismo en un lote de pipetas.
- Controlar el factor humano, usando una misma pipeta, pero con diferentes personas.
- Comparar dos tipos de pipetas entre sí para detectar si hay diferencias entre ellas.

Los modelos estadísticos a usar son: el modelo de Student y el Chi-cuadrado para una sola muestra, y los modelos de Student para dos muestras independientes y el de Fisher para comparar dos muestras entre sí.

El método consiste en realizar una serie de n mediciones con la misma pipeta y con el mismo volumen de agua. La variabilidad en las mediciones puede deberse al operador o a la balanza. El operador puede cometer errores de paralaje al medir; por ejemplo, si se ubica mal frente a la misma, o no la pone vertical al sostenerla con la mano en lugar de usar un apoyo fijo, o no verifica que la línea indicadora en la pipeta pase por el centro del menisco, etc. A su vez, la balanza tiene fluctuaciones como: vibraciones indeseadas (se soluciona con una base sólida, horizontal y aislada con material tipo tergopol que absorbe las vibraciones); vibraciones por la fuente eléctrica de alimentación (se soluciona con un estabilizador tipo UPS que mejora este tipo de problemas); mal cierre de las ventanas laterales; etc. Todas estas posibles causas, si bien pueden ser evitadas con un protocolo adecuado, no dejan de incidir en las mediciones afectando la precisión y exactitud. Por otro lado, pueden existir defectos constructivos de la pipeta tales como: caras no paralelas, dilatación por calor, etc., los que van a atentar contra la exactitud. El método de calibración es:

Paso 1) Colocar un frasco de vidrio adecuado en tamaño, limpio y seco, dentro de la balanza y luego pesarlo para tener el valor de la tara.

Paso 2) Se mide un volumen de agua prefijado con la pipeta y luego se vuelca el agua dentro del frasco en la balanza. Se pesa todo el conjunto y por diferencia de pesadas, se calcula el primer valor buscado.

Paso 3) Se repite este procedimiento n veces y con los n valores se calcula el promedio de las pesadas y su desvío estándar.

Paso 4) Se verifica exactitud con el modelo Student y precisión con la Chi-cuadrado. Así se decide si la pipeta está bien calibrada.

Ejemplo 1) Se desea controlar una pipeta de 5 ml. Para ello, se carga 5 veces al máximo la pipeta con agua tridestilada y se procede a pesar. Decidir si la pipeta está bien calibrada si los datos obtenidos fueron:

Cuadro 23.1: Control de una pipeta de 5 ml

Nº	Pesada	Diferencia de pesadas	Valor final	Promedio	Desvío
T	72,3465				
1	77,3876	77,3876 - 72,3465	5,0411		
2	82,4251	82,4251 - 77,3876	5,0375		
3	87,5213	87,5213 - 82,4251	5,0962	5,05932	0,04083
4	92,5348	92,5348 - 87,5213	5,0135		
5	97,6431	97,6431 - 92,5348	5,1083		
Total			25,2966		

Control de exactitud: Modelo de Student para una sola muestra.

Ho : $\mu = 5$ ml Está calibrada.

H1 : $\mu \neq 5$ ml Hay un error sistemático

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{DS/\sqrt{n}} = \frac{5,05932 - 5}{0,04083/\sqrt{5}} = 3,248^* > t_{0,95; 4} = 2,776$$

Se rechaza la Ho y se puede estimar el error sistemático de esta pipeta en ES = 0,05932 ml. Por lo tanto, se puede corregir cada medición que se haga con esta pipeta restando esa cantidad al valor medido. O bien, desecharla directamente por otra mejor calibrada.

Control de precisión: Modelo de Chi cuadrado.

Ho : $\sigma \leq 0,1$ ml Tiene una precisión aceptable.

H1 : $\sigma > 0,1$ ml Hay un error casual no aceptable.

$$\chi^2 = (n-1) DS^2 / \sigma^2 = (5 - 1) (0,04083)^2 / (0,1)^2 = 0,6668 < \chi_{0,95; 4} = 11,143$$

El valor máximo admisible de dispersión se tomó como el valor mínimo de la graduación de la pipeta (0,1 ml) y los resultados no son significativos, esto es, la pipeta aprueba el control de precisión. En este caso, más que la pipeta, lo que está verificando es la interacción entre el observador y la pipeta. Es más probable que de haber un error casual muy grande, la mayor parte de la variabilidad se deba al observador.

En cambio, si se toma un $\sigma \leq 0,01$ ml; el estadígrafo resultante sería $\chi^2 = 66,68^{***}$, un resultado altamente significativo de falta de precisión. O sea, a medida que se exigen valores máximos admisibles más estrictos, es más fácil perder precisión. Parece razonable usar la menor unidad de la escala de lectura del instrumento como límite máximo.

En el ejemplo anterior, como el instrumento es de escala continua, se puede apreciar hasta la mitad de la menor unidad de la escala (error de apreciación). Si se usa tal valor, sería:

Ho : $\sigma \leq 0,05$ ml y entonces $\chi^2 = 2,67$ ml valor no significativo. La pipeta se considera con precisión aceptable, aún cuando su valor máximo admisible se redujo a la mitad.

Esta metodología se puede extender a otros casos de verificación como los siguientes:

Controlar un lote de pipetas del laboratorio:

Para esto se eligen n pipetas al azar (o a todas) cuya capacidad sea por lo menos de 1 ml. Se elige como valor de testigo a un valor como el de la pipeta más pequeña, por caso: 2 ml. Se carga a cada una de las pipetas con 2 ml de agua y se procede a pesar los volúmenes obtenidos, siguiendo el esquema del ejemplo anterior, por diferencias de pesadas. Entonces se pueden verificar varias cosas de acuerdo al diseño del experimento:

(a) Con el modelo Student para una muestra, se puede decidir si la exactitud es aceptable, no importa con cual de las pipetas habituales se esté trabajando.

(b) Con el modelo de la Chi cuadrado, se puede decidir si la dispersión es aceptable con:

- Un solo operador de las pipetas.
- Todos los operadores habituales, cada uno con su pipeta de trabajo usual.

Estudiar el efecto del factor humano en la medición con pipetas:

Esto es, descubrir si con una misma pipeta, pero empleada por diferentes personas, la precisión y exactitud no se ven afectadas. Para ello, se elige alguna de las pipetas calibradas con el procedimiento descrito en el primer ejemplo, que haya pasado los controles de exactitud y precisión. Luego, cada miembro del laboratorio afectado al tema debe medir los 5 ml de agua. Se tiene así un grupo de pesadas a las que se les aplica el mismo método para determinar si aun se mantiene con una calidad aceptable. Caso contrario, significa que el factor humano afecta las mediciones clínicas del laboratorio. Para descubrir quien o quienes son los responsables y así poder enseñarles una mejor manera de medir, se prueba a los sospechosos haciéndoles repetir el método del primer ejemplo, hasta descubrir quien o quienes no pasan la prueba. Aquel que no pase el test estadístico deberá ser mejor entrenado hasta lograr que trabaje con una calidad aceptable.

Comparar dos tipos de pipetas:

La idea es detectar si hay diferencias entre ellas. Pueden ser dos marcas comerciales, dos capacidades diferentes, etc. También se pueden comparar dos personas o dos lotes diferentes. El modelo adecuado para controlar exactitud en estos casos es el de Student para comparar dos muestras independientes. Para verificar la precisión se debe usar el modelo F de Fisher para compararlas entre sí. Sea por ejemplo, usar la pipeta del primer ejemplo como la A, y con otro tipo de pipeta repetir el procedimiento para la pipeta B. Por ejemplo,

Cuadro 23.2: Control de otra pipeta de 5 ml

Nº	Pesada	Diferencia de pesadas	Valor final	Promedio	Desvío
T	72,3465				
1	77,3601	77,3601 - 72,3465	5,0136		
2	82,3986	82,3986 - 77,3601	5,0385		
3	87,3913	87,3913 - 82,3986	4,9927	5,01106	0,01848
4	92,4066	92,4066 - 87,3913	5,0153		
5	97,4018	97,4018 - 92,4066	4,9952		

Total

25,0553

Control de exactitud de la pipeta B: Modelo de Student para una sola muestra.

Ho : $\mu = 5$ ml Está calibrada.

H1 : $\mu \neq 5$ ml Hay un error sistemático

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{DS/\sqrt{n}} = \frac{5,01106 - 5}{0,01848/\sqrt{5}} = 1,338 < t_{0,95;4} = 2,776$$

No se rechaza la Ho y se puede considerar que tiene buena exactitud.

Control de precisión de la pipeta B: Modelo de Chi cuadrado.

Ho : $\sigma \leq 0,1$ ml Tiene una precisión aceptable.

H1 : $\sigma > 0,1$ ml Hay un error casual no aceptable.

$$\chi^2 = (n-1) DS^2 / \sigma^2 = (5 - 1) (0,01848)^2 / (0,1)^2 = 0,0876 < \chi_{0,95;4} = 11,143$$

No se rechaza la Ho y se puede considerar que tiene buena precisión.

Como conclusión la pipeta B ha pasado los controles de exactitud y precisión, por lo que puede considerarse con calidad aceptable. Suponiendo que el mismo operador ha realizado ambos grupos de mediciones, ahora se puede pensar que el error sistemático de la pipeta A se origina en la misma y no en el operador. Pero también se pueden comparar ambas pipetas entre sí:

Comparación de pipetas A y B en exactitud: Modelo Student para dos muestras independientes.

Ho : $\mu_A = \mu_B$ No hay diferencia entre las pipetas.

H1 : $\mu_A \neq \mu_B$ Hay diferencia entre ambas.

$$t = \frac{(\bar{x}_A - \bar{x}_B) - 0}{\sqrt{(1/n)(DS^2_A + DS^2_B)}} = \frac{5,05932 - 5,01106}{\sqrt{(1/5)\{(0,04083)^2 + (0,01848)^2\}}} = 2,413^* < t_{0,95;8} = 2,306$$

Se encontró una diferencia significativa entre ambas pipetas.

Comparación de pipetas A y B en precisión: Modelo de Fisher.

Ho : $\sigma_A = \sigma_B$ No hay diferencia entre las pipetas.

H1 : $\sigma_A \neq \sigma_B$ Hay diferencia entre ambas.

$$F = DS^2_A / DS^2_B = (0,04083)^2 / (0,01848)^2 = 4,882$$

Los valores críticos son: $F_{0,975;4;4} = 9,6$ y $F_{0,025;4;4} = 1 / F_{0,975;4;4} = 1/9,6 = 0,104$

Como el valor $F = 4,882$ está dentro de la zona de aceptación, no se puede rechazar la hipótesis nula y se considera que ambas pipetas son equivalentes en precisión. La conclusión final es que conviene descartar la primer pipeta y quedarse con la segunda.

Es conveniente resumir el uso de los modelos estadísticos vistos en este tema:

Calibración usando un patrón

Control de exactitud: Modelo Student para una sola muestra

Control de precisión: Modelo Chi-Cuadrado para una sola muestra

Comparación de dos muestras

Control de exactitud: Modelo Student para dos muestras independientes

Control de precisión: Modelo F de Fisher para dos muestras independientes

23.3.3 Calibración de capilares

Para controlar capilares lo más sencillo es dedicarse a la precisión de los mismos pues se pueden usar métodos directos y baratos. Sea el caso de los capilares usados para el método del *microhematocrito* (mH). Se pueden cargar con la misma sangre entera 10 tubos elegidos al azar del envase de 500 tubos. Se colocan estas muestras en una micro centrífuga, y se procesan todos a la vez. Una vez efectuadas las determinaciones con el mismo ábaco y el mismo operador, se tienen 10 valores que deberían ser iguales en el caso ideal. Si se toman los recaudos apropiados al procesar las muestras, la variabilidad mayor se deberá principalmente a variaciones en el diámetro de los capilares usados. Naturalmente, siempre existen fluctuaciones por azar que se suman al total de los errores detectados. El problema es determinar si el total de la variabilidad encontrada se halla por debajo del límite de tolerancia aceptable. De la bibliografía clínica, surge un coeficiente máximo de variación del orden del 2%. Pero cada laboratorio puede auto imponerse un límite razonable, no supere al $CV = 7\%$ del macrohematocrito o el $CV = 5\%$ para el mH.

Con los n valores obtenidos se calculan la media y el desvío estándar muestral. La idea es controlar que este valor no supere el límite máximo admisible, dado por la relación $\sigma_{\text{máx}} = 2\%$. Con estos datos se pueden formular un test de hipótesis con el modelo de la Chi-cuadrado. Para verificar el supuesto $DS \leq \sigma_{\text{máx}} = 2\%$.

De esta manera se controla si la dispersión del diámetro de los capilares es significativo para las mediciones del mH. A su vez, si se repite el procedimiento con otra marca comercial de capilares, se pueden plantear un test de validación entre ambas marcas, usando el modelo F de Fisher para contrastar varianzas. Lo mismo para comparar dos micro centrífugas, dos ábacos de lectura y aún, a dos operadores entre sí.

El control de exactitud es más costoso por la dificultad de hacerse de una "sangre patrón", en el mercado. Esa dificultad se subsana a través de algún método indirecto, obteniendo un control de tipo secundario. Por ejemplo, medir la sangre usada en un contador hematológico bien calibrado, que se acepte como referencia. Así, cualquier sangre puede ser utilizada para el expe-

rimento, si se toma el costo de enviarla a calibrar en un laboratorio adecuado. Esto es más barato que comprar una sangre calibrada en el mercado, como otro tipo de solución.

Pero si se tiene una sangre calibrada, entonces se puede hacer lo mismo que en el control de las pipetas. Esto es, se postula que el valor medio encontrado del mH no difiere del valor referencial. Y se valida con el modelo de Student para una sola muestra. Cuando la hipótesis nula no puede ser rechazada, se pueden considerar aceptables los restantes capilares del envase. Por el contrario, si se rechaza la misma, se tiene evidencia científica como para reclamar la devolución de esta mercadería fallada al proveedor.

23.3.4 Calibración de micropipetas

El método de calibración de las micropipetas es enteramente similar al visto para las pipetas en el punto anterior. La diferencia fundamental es que, en lugar de usar agua tridestilada, se necesita una sustancia mucho más pesada como el mercurio bidestilado, para lograr un peso apreciable con poca cantidad. La ventaja es que pequeños volúmenes de mercurio tienen un peso considerable y no se pierde la precisión de la balanza. Se aprovecha mejor el bajo coeficiente de variabilidad de ésta. La desventaja es la alta dilatación del mercurio con la temperatura, por lo que se necesita corregir este factor. La otra, es la necesidad de un lavado exhaustivo con ácido para eliminar todo el resto de mercurio de la micropipetas y, además, su mayor costo en comparación con el costo del agua.

Existe una gran diversidad de micropipetas en el laboratorio clínico. Resulta importante el tener un buen control sobre este instrumental si se tiene en cuenta que es la base de muchas determinaciones habituales. Por ejemplo, las pipetas de Thoma para medir eritrocitos y leucocitos se emplean para diluir la sangre entera de los pacientes y así determinar el conteo de la cantidad de glóbulos por mm^3 . En la Figura 23.1 se han esquematizado dos de estas pipetas: la pipeta para recuento de los rojos consta de un tubo capilar graduado y dividido en diez partes. Marcado con un 0,5 en la quinta señal y con 1 en la décima. Luego viene una ampolla o pera para efectuar la dilución con una bolita de cristal rojo en su interior. En la parte superior tiene una marca con la indicación 101. En la otra pipeta empleada para diluir la sangre en el recuento de blancos, la bolita dentro de la ampolla es blanca, la marca superior dice 11, mientras en el resto son similares. El volumen de la pipeta de eritrocitos esta constituido por una parte del capilar (hasta 0,5) de sangre entera; luego se aspira el líquido diluyendo hasta la marca 101 (es decir el resto del capilar y la ampolla). De esta forma se logra efectuar diluciones 1: 200 con un volumen total de 1 cm^3 . En la pipeta para diluciones en recuento de leucocitos, se procede en forma análoga llegando hasta la marca de 0,5, y luego con diluyente hasta la marca 11, para obtener una dilución de 1: 20. Debe destacarse que el líquido diluyente que queda en el capilar no entra en el cálculo, por lo tanto, debe ser eliminado antes de realizar llenado de la cámara. Aquí es fácil ver que una mala calibración en la micropipeta influirá notablemente en recuento final; en especial el capilar.

Otras de la micropipetas empleadas en los laboratorios clínicos, es la pipeta Sahli. Esta micropipeta tiene una capacidad de 0,02 cm^3 y se carga en ella sangre entera tomada de una punción capilar, o bien, de sangre venosa. Este volumen de sangre debe ser colocado en una cubeta que contenga 5 cm^3 de una solución (llamada de Drabkin). Mezclando adecuadamente y dejando

reposar no menos de diez minutos, se forma la *cianometahemoglobina*. Con fotómetro de filtro, o espectrofotómetro, se puede determinar la concentración de la hemoglobina en la sangre. Esta proteína conjugada es la componente principal de los glóbulos rojos, ya que sirve para el transporte de oxígeno y del CO₂ en la sangre; tiene una importancia muy grande en todos los procesos corporales al llevar el O₂. Totalmente saturada, la hemoglobina transporta 1,34 cm³ de O₂ por gramo. Una persona adulta tiene en su organismo unos 600 g de hemoglobina, los que son capaces de transportar unos 800cm³ de oxígeno para el cuerpo humano. Esta micropipeta se esquematiza en la figura en la posición más a la derecha de la Figura 23.1.

Figura 23.1: Micropipetas

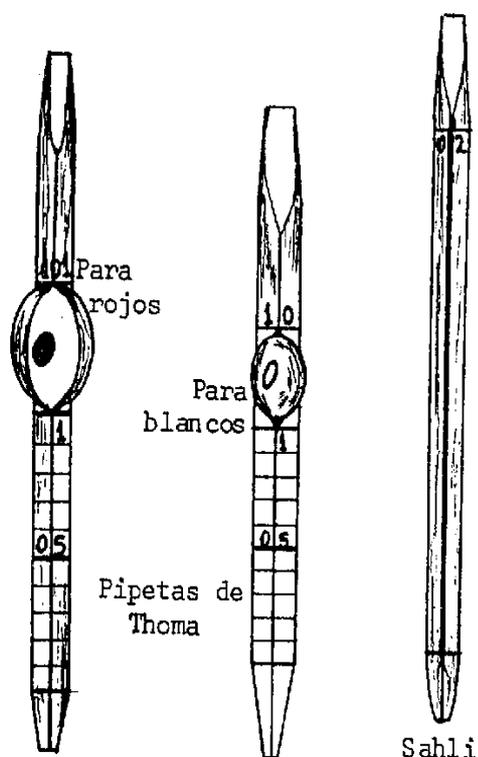
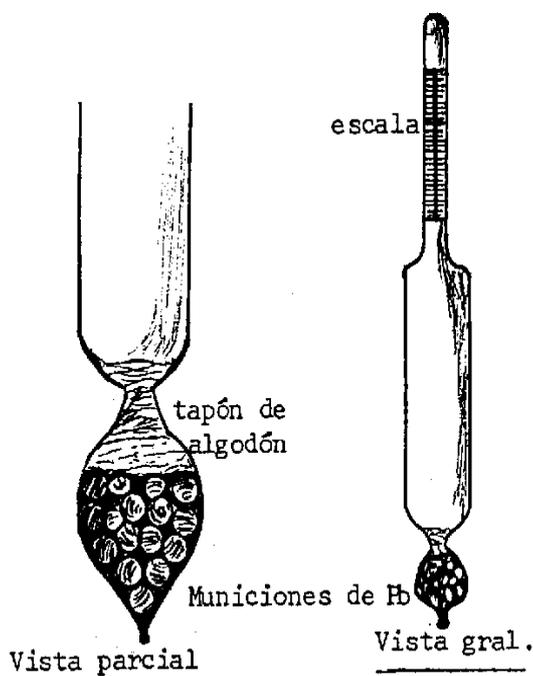


Figura 23.2: Urodensímetros



Vista la importancia de tener muy bien calibradas las micropipetas para el trabajo clínico, en particular la exactitud de los volúmenes muy pequeños que miden, se procederá a mostrar un método sencillo de calibración. Stevenson et al publicaron en 1951 un trabajo en *American Journal of Clinical Pathologist* en el cual se basa este experimento. La idea básica es llenar la micropipeta con un volumen de un líquido de densidad conocida, pesar dicho volumen y verificar si coincide con el indicado en la micropipeta. Como los volúmenes de trabajo son muy pequeños, no se puede usar agua destilada en muchos casos, debido que la masa a pesar es muy pequeña y se requiere mucha precisión en la balanza. Suponiendo que se llena la pipeta con mercurio bides-tilado, por ejemplo una pipeta Sahli cuyo volumen es de 0,02 cm³, entonces se puede pesar el mercurio contenido dentro de la pipeta si se lo coloca en un frasco vacío. Sea M la masa de un frasco vacío, M' la masa del frasco con el mercurio que contenía la micropipeta, entonces la masa del mercurio es la diferencia entre ambas pesadas: $m = M' - M$

Si se mide la temperatura del mercurio durante la pesada se puede ir a una tabla como la siguiente, para determinar la densidad del mismo a la temperatura del trabajo:

Tabla 23.1: Variación de la densidad del mercurio con la temperatura.

Temperatura °C	Densidad Hg g/cm ³	Temperatura °C	Densidad Hg g/cm ³
20,0	13,547	25,5	13,5465
20,5	13,546	26,0	13,5340
21,0	13,545	26,5	13,5330
21,5	13,544	27,0	13,5320
22,0	13,543	27,5	13,5310
22,5	13,542	28,0	13,5300
23,0	13,541	28,5	13,5290
23,5	13,540	29,0	13,5280
24,0	13,539	29,5	13,5270
24,5	13,538	30,0	13,5260
25,0	13,537	30,5	13,5250

De esta forma el volumen de la micropipeta (V) debe obtenerse con:

$$V = m / d$$

Ejemplo 1) Se ha pesado mercurio bidestilado con una pipeta Sahli. Los valores obtenidos son:

$M = 39,8731 \text{ g}$; $M' = 40,1311 \text{ g}$ y la temperatura es de $29 \text{ }^\circ\text{C}$. Luego,

$m = 40,1331 - 39,8731 = 0,2580 \text{ g}$ A $29 \text{ }^\circ\text{C}$ es $d = 13,528 \text{ g / cm}^3$ de tablas

$V = 0,2580 / 13,528 = 0,01907 \text{ cm}^3$

Entonces el factor de corrección para tal pipeta será:

$$k = 0,01907 / 0,02 = 0,96$$

Por lo tanto, cuando se mida $0,02 \text{ cm}^3$ de mercurio con la pipeta, hará que usar el factor de corrección y queda así $0,01907 \text{ cm}^3$. El problema ahora es poder determinar el error que afecta a ese valor, para ello se debe usar el concepto de propagación de errores:

a) Hay que considerar la medición de la temperatura, el termómetro usado tiene un error de apreciación de $0,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Entonces, $t \in (28,5 ; 29,5) \text{ }^\circ\text{C}$ y $d \in (13,527 ; 13,529)$. O sea se puede expresar como $d \in (13,528 \pm 0,001) \text{ g / cm}^3$. O sea, $\Delta d = 0,001 \text{ g / cm}^3$

b) Hay que tomar en cuenta el error de la masa, como se ha calculado el valor por diferencia de pesada, el error $\Delta m = 0,002$ será el doble que el error de apreciación.

c) Aplicando la fórmula de propagación de errores se puede calcular:

$$(\Delta V)^2 = \sum_1^n \left[\left(\frac{\partial V}{\partial x_i} \right) \Delta x_i \right]^2 = \left(\frac{\Delta m}{d} \right)^2 + \left(\frac{m \cdot \Delta d}{d^2} \right)^2 = \left(\frac{0,002}{13,528} \right)^2 + \left(\frac{(0,258) \cdot (0,001)}{183} \right)^2 = 0,022 \cdot 10^{-6}$$

$\Delta V = 0,15 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3$. Por lo tanto, la estimación de volumen de la micropipeta es:

$$V \in (0,01907 \pm 0,00015) \text{ cm}^3$$

Notar, que el valor marcado en la micropipeta es de $0,02 \text{ cm}^3$ y cae fuera del intervalo anterior. Esto implica la presencia de un error sistemático evaluado $ES = 0,00093 \text{ cm}^3$ por defecto. Luego, para calibrar la micropipeta hay dos caminos: o se remarca con una punta de diamante, o bien, se corrigen los valores con fórmulas. Para finalizar se debe lavar la micropipeta con ácido nítrico concentrado y luego con agua, hasta eliminar todo rastro del mercurio.

23.3.5 Calibración de urodensímetros

El método de urodensímetro se basa en sumergir el aparato en el seno de la masa líquida, donde recibe un empuje de abajo hacia arriba igual al peso del volumen del líquido desalojado. Cuando se equilibran el peso del aparato y el empuje recibido, este flota dejando sumergido un cierto volumen calibrado que permite leer en una escala la densidad del líquido directamente. Como el volumen del aparato siempre es el mismo, los diferentes empuje que reciba dependen de la densidad de los líquidos analizados. Variando el peso del aparato se puede hacerlo flotar de manera de poder leer en la escala. Para ello, se colocan granallas de plomo en el bulbo de su extremo inferior (ver Figura 23.2) y se regula su peso. En la parte superior tiene una varilla con la escala graduada en densidad. Hay densímetros especiales con escalas graduadas en unidades especiales, por ejemplo, el alcoholímetro que mide directamente la graduación alcohólica de bebidas; otras miden en los llamados "grados Baumé" donde el ácido sulfúrico comercial tiene una densidad de 66° ($d = 1,85 \text{ g/cm}^3$).

En clínica, este aparato se usa para medir densidades de orina y de ahí su nombre. Su escala se gradúa entre 1 y $1,06 \text{ g/cm}^3$ para 15°C de temperatura. Los valores de referencia varían de acuerdo a la edad del paciente: en lactantes va de $1,001$ a $1,035 \text{ g/cm}^3$ y en adultos de $1,016$ a $1,035 \text{ g/cm}^3$. Las orinas de baja densidad se denominan *hipostenúricas* ($d < 1,007 \text{ g/cm}^3$). Los solutos disueltos en una orina normal influyen mucho en su densidad (fosfato 25%, cloruros 25% y urea 20%). Este método tiene varias correcciones: una es por temperatura, otra es por el contenido de glucosa y proteínas. Esto escapa a los alcances del presente trabajo, por lo que se dará una idea general de la calibración. Los pasos a seguir son:

Paso 1) Se prepara un patrón acuoso con ácido sulfúrico puro y agua tridestilada, hasta lograr una concentración adecuada. Por ejemplo, $2,029 \text{ g}$ de ácido en 100 cm^3 de agua, da una solución con $d = 1,015 \text{ g/cm}^3$.

Paso 2) Se llena el vaso del urodensímetro con el patrón, hasta 3/4 de su capacidad y se coloca con cuidado el aparato, dándole una ligera rotación y dejando que flote libremente. Evitando la formación de burbujas. El aparato no debe tocar las paredes del recipiente.

Paso 3) Se mide la temperatura y se lee en la escala usando el fondo del menisco, efectuando si corresponde, las correcciones por temperatura.

Paso 4) Se repite varias veces el procedimiento y con los valores obtenidos se calcula el promedio y el desvío estándar de las mediciones.

Paso 5) Se realizan los tests estadísticos para controlar precisión y exactitud, como se vio en los puntos anteriores tratados.

23.4 Calibración de espectrofotómetro

El método para calibrar este instrumento debe ser la recta de calibración. Sin embargo, cuando se desee controlar un valor en particular se simplifica la recta a un solo caso. La idea básica del control es preparar patrones calibrados de absorbancia y con ello revisar periódicamente el valor leído por el equipo. Si se tienen definidos los límites de aceptación para cada una de estas lecturas, se puede controlar si el espectro se mantiene en los límites de calidad aceptables. Es importante seguir un protocolo de mantenimiento y limpieza preventivo.

Para preparar los patrones hay varias maneras. Lo más sencillo y caro es adquirir los patrones en el INTI o en algún comercio especializado. Lo más aconsejable es recurrir al fabricante del aparato, que puede asesorar gratuitamente al respecto. Además si éste cumple con las Normas Internacionales de Calidad, tal como la ISO 9001 o 9002, seguramente tiene toda esta temática resuelta. La otra manera más barata, pero más complicada, es que el laboratorio se fabrique los patrones por sí mismo y luego los mande calibrar a los centros referencia. En la República Argentina esta función la cumple el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) a cuyo cargo están los patrones del Sistema Internacional de Unidades y sus derivados. Es el único ente legalmente habilitado para cumplir esa función.

Un espectrofotómetro es básicamente un equipo que emite un rayo de luz que atraviesa una cubeta de caras paralelas con la sustancia a analizar. Mide la absorbancia (o transmitancia) de la tal sustancia, y con un cierto factor informa la concentración del analito buscada. Se pueden fabricar valores de referencia en forma económica. Una manera es conseguir acrílicos de diferentes tonalidades, y tallar con él cubetas de caras paralelas que simulen un cierto líquido adentro. Más barato aún es llenar cubetas con una mezcla de agua y tintas de colores, logrando tonalidades específicas para el control. Luego se sellan estas cubetas con láminas de vidrio y pegamento epoxi transparente colocado por fuera. Una vez que se tenga el conjunto de cubetas coloreadas, muy estables en el tiempo, se las manda a calibrar a un laboratorio de referencia. Y a partir de allí, se cuenta con un juego de valores referenciales que permiten controlar al espectro en forma permanente. Los pasos a seguir en un control son:

Paso 1) Con agua tridestilada se llena la cubeta y se calibra el 0 de la escala.

Paso 2) Se elige una de las cubetas patrones con la absorbancia que se desea controlar. Se repite n veces esta medición y se calcula el promedio y desvío estándar de los valores medidos.

Paso 3) Con el método Student se controla exactitud y con Chi-cuadrado precisión, en forma totalmente análoga a las descriptas más arriba.

23.5 Calibraciones microbiológicas

Los instrumentos principales en Microbiología son dos: el baño maría y la incubadora o estufa de cultivo. Los límites de tolerancia internacionales para estos dos equipos son:

Baño maría : Entre 36 y 38° C o sea (37° C \pm 1° C)
Estufa de cultivo: Entre 34 y 36° C o sea (35° C + 1° C)

La manera de ver si cumplen estos requisitos es bastante sencilla se debe tomar nota de los valores de temperatura a intervalos regulares de tiempo y verificar si están calibrados. En principio hay dos maneras de hacerlo. La primera vez que se hace un control de este tipo, se pueden tomar los valores de la temperatura cada 15 o 30 minutos, hasta juntar entre 20 y 30 valores. Es decir, basta con un día para completar el experimento. Una vez que se verifica que el equipo está calibrado se puede proceder con la segunda forma de control. En este caso se toma la temperatura en forma diaria y se vuelca en una Carta de Control de calidad, como se explicará más adelante. El empleo de las cartas es para asegurarse que el equipo se mantenga estable en el tiempo. Una vez por mes se debe efectuar una limpieza a fondo a modo de mantenimiento preventivo de acuerdo a lo que aconsejan las normas internacionales.

Ejemplo 1) Para controlar por primera vez un baño maría se tomaron cada media hora los valores de temperatura indicados por un termómetro que fue previamente calibrado. Los resultados de 30 mediciones arrojaron un promedio de 37,5° C con un desvío de 0,42° C. Se desea verificar si el instrumento tiene una exactitud y precisión aceptables. (Datos: Dra. Desimoni M.C.)

Para realizar el control de exactitud se puede emplear el modelo de Gauss o el más exacto de Student teniendo en cuenta que los requisitos son: (37° C \pm 1° C). Entonces:

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{DS/\sqrt{n}} = \frac{37,5 - 37}{0,42/\sqrt{30}} = 6,52 \gg t_{0,999; 29} = 3,659$$

Se ha encontrado evidencia altamente significativa que muestra un error sistemático de 0,5° C Para controlar la precisión se usa el modelo de la Chi-cuadrado teniendo en cuenta que el desvío máximo admisible es de 1° C. Entonces:

$$\chi^2 = (n-1) DS^2 / \sigma^2 = (30 - 1) (0,42)^2 / (1)^2 = 5,12 < \chi_{0,95; 29} = 42,557$$

Resulta que no hay evidencia como para pensar que la precisión del equipo no es aceptable.

Ejemplo 2) Para controlar una estufa de cultivo de tomaron 27 determinaciones de la temperatura a intervalos de 15 minutos. Se obtuvo una media de 35,41° C y un desvío de 0,41° C. Se desea saber si el equipo tiene exactitud y precisión aceptables para las normas internacionales. (Datos de la Dra. Piccoli, L.I.)

Para realizar el control de exactitud se puede emplear el modelo Student teniendo en cuenta que los requisitos son: (35° C ± 1° C). Entonces:

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{DS/\sqrt{n}} = \frac{35,41 - 35}{0,41/\sqrt{27}} = 5,2 \gg t_{0,999; 26} = 3,707$$

Se ha encontrado evidencia altamente significativa que muestra un error sistemático de 0,41° C

Para controlar la precisión se usa el modelo de la Chi-cuadrado teniendo en cuenta que el desvío máximo admisible es de 1° C. Entonces:

$$\chi^2 = (n-1) DS^2 / \sigma^2 = (27 - 1) (0,41)^2 / (1)^2 = 4,37 < \chi_{0,95; 29} = 38,885$$

Resulta que no hay evidencia como para pensar que la precisión del equipo no es aceptable.

El análisis de ambos aparatos en los ejemplos anteriores muestra un error de tipo sistemático en ambos. Mientras que el baño maría calienta más de lo debido, la estufa trabaja calentando menos de lo necesario. La conclusión es que se deben enviar los equipos al fabricante para que regule mejor la termocupla interna de los mismos. Notar que es importante efectuar estos controles con termómetros previamente calibrados para evitar falsos resultados. Lo hallado en ambos ejemplos se puede presentar con intervalos de confianza de la manera siguiente:

El intervalo de confianza para un 95% es: $(\bar{x} \pm \Delta x) = (\bar{x} \pm t_{0,95; n-1} DS / \sqrt{n})$

Luego hay que fijarse si el valor poblacional μ cae dentro o fuera de este intervalo

Aplicando la ecuación anterior a los ejemplos es:

Baño María: 95% CI (37,34 ; 37,66)° C El valor esperado 37° C cae fuera del mismo

Estufa: 95% CI (35,25 ; 35,57)° C El valor esperado 35° C cae fuera del mismo

23.6 Otras calibraciones

Hay instrumentos automáticos que incluyen su propio sistema de Control de Calidad. Sin embargo, es conveniente que el profesional pueda realizar controles sobre este tipo de equipamiento, usando el bagaje de los métodos vistos.

Contador hematológico: Estos cuentan las células hasta tres veces antes de informar rojos, blancos y plaquetas. Algunos como el Technicon H 6000 brinda gráficos de la campana de Gauss pa-

ra recuento de blancos y plaquetas, además del hemograma completo y de otros valores. La manera de controlar un equipo así, es conseguir sangre de referencia o control y con mediciones repetidas de la misma muestra se puede validar precisión y exactitud. Pero, en caso de no tener disponible un patrón, con cualquier sangre se puede controlar por lo menos, la precisión, y luego estudiar la exactitud comparando las mediciones hechas con otras técnicas.

Auto analizador clínico múltipara métrico: Un equipo como el Metrolab 2100, puede efectuar 18 tests por muestra a 36 sueros simultáneos. Su capacidad es de 100 a 180 tests por hora y emplea una cantidad de 350 μ l de suero por test. Nuevamente, consiguiendo suero control se lo puede colocar hasta en 36 viales, para tener otras tantas mediciones y controlar así su precisión y exactitud en forma análoga a los anteriores.

23.7 Problemas propuestos

1) Marcar la respuesta correcta a cada una de las afirmaciones siguientes, o completar la frase:

- | | | |
|---|-------|-------|
| 1) Para controlar un instrumento conviene usar una recta de calibración. | V | F |
| 2) Explicar el concepto de propagación de errores en mediciones:..... | | |
| 3) El modelo Student se usa para controlar exactitud. | V | F |
| 4) Explicar los pasos a seguir para calibrar una balanza:..... | | |
| 5) Se puede controlar un aparato y su operador en conjunto o por separado. | V | F |
| 6) Explicar los pasos a seguir para controlar una pipeta:..... | | |
| 7) Ídem anterior, pero para una micropipeta:..... | | |
| 8) Para controlar precisión se usa el modelo de la Chi-cuadrado. | V | F |
| 9) Para controlar la dispersión de dos aparatos se usa el modelo de la Chi-cuadrado. | V | F |
| 10) Resumir el concepto general de calibraciones usando patrones:..... | | |
| 11) Explicar las diferencias principales en calibrar capilares y micropipetas:..... | | |
| 12) La variación de volumen por temperatura no influye demasiado. | V | F |
| 13) Los urodensímetros son totalmente diferentes a los alcoholímetros. | V | F |
| 14) Para calibrar espectrofotómetros conviene recurrir al consejo del fabricante. | V | F |
| 15) Explicar las causas por las cuales el profesional debe aprender calibraciones:..... | | |