

# Programa de evaluación de la calidad entre laboratorios.

## XX. Verificación del uso y funcionamiento de micropipetas

Sergio I. Alva-Estrada,<sup>1</sup> Esther del Carmen Uhthoff-Brito,<sup>2</sup> Lilia M. Fuentes-Mancilla,<sup>1</sup> Elvia M. Cabañas-Cortés<sup>1</sup>

### Abstract

The usefulness and reliability of clinical tests depend on variation sources control. One of the most important variation causes is the volume measurement and it is controlled by periodically monitoring and/or calibration of the used instruments. Micropipettes can be verified using gravimetric or photocolometric methods. The first one requires an analytical balance and the second one calibrated pipettes, which are not available for some clinical laboratories.

This paper presents a photocolometric procedure that allows to evaluate simultaneously, of reliable and simple way, the right use, precision and accuracy of micropipettes, without the dependency of mentioned resources.

**Keywords.** *Quality control. Quality assurance. External quality control. Internal quality control.*

### Resumen

La utilidad y confiabilidad de los análisis clínicos dependen del control de las fuentes de variación, entre ellas, la medición de volúmenes es de especial importancia y se debe realizar a través de la verificación y/o calibración periódica de los instrumentos utilizados.

Las micropipetas pueden ser verificadas por el método gravimétrico o el fotocolométrico; para el primero se necesita balanza analítica y para el segundo, pipetas previamente calibradas; recursos limitantes para algunos laboratorios.

En este trabajo se presenta un método fotocolométrico, que permite evaluar simultáneamente de manera confiable

y sencilla, el uso correcto, la precisión y la exactitud de las micropipetas, sin la dependencia de los recursos antes mencionados.

**Palabras Clave.** *Calidad. Variaciones analíticas. Control de calidad interno. Control de calidad externo.*

### Introducción

La utilidad y confiabilidad de los análisis clínicos dependen de que se controlen o limiten las diversas fuentes de variación.<sup>(1-3)</sup> En la etapa analítica, la medición de volúmenes es una de las fuentes de variación más importantes y debe ser controlada con la verificación y/o calibración periódica de los distintos instrumentos que se utilizan.<sup>(4)</sup>

Dentro de las actividades del Programa de Evaluación de la Calidad Entre Laboratorios (PECEL) se han realizado numerosas visitas de trabajo a diferentes laboratorios. Comúnmente, la causa de imprecisión y/o inexactitud en sistemas analíticos manuales es que no verifican periódicamente el uso y funcionamiento de sus micropipetas. En consecuencia, al hacerlo se obtienen coeficientes de variación (CV) y porcentajes de error elevados (hasta 15 y 40% respectivamente). También se han identificado CVs elevados por el manejo de las mismas. Se ha observado que entre las razones por las que no se verifican las micropipetas es porque no saben cómo hacerlo y/o carecen de los recursos necesarios para llevar a cabo el método gravimétrico<sup>(4-6)</sup> o el fotocolométrico.<sup>(4)</sup>

Para el primero se necesita balanza analítica, con la que muchos laboratorios no cuentan actualmente y que tiene un costo elevado (30,000 pesos o 300 USD). Para el método fotocolométrico se requiere de una pipeta previamente calibrada con el método gravimétrico<sup>(4)</sup> y en consecuencia requieren igualmente de la balanza analítica. En este trabajo se presenta un método fotocolométrico que permite evaluar simultáneamente y de manera sencilla, el uso correcto de las pipetas (CV del usuario) y el funcionamiento de las mismas (CV y error de la pipeta), eliminando la carencia de la balanza analítica y de micropipetas previamente calibradas.

<sup>1</sup> Profesores investigadores del Departamento de Bioquímica, ENCB-IPN; becarios de COFAA y del Programa de Estímulo al Desempeño Docente.

<sup>2</sup> Profesora investigadora del Departamento de Asistencia Técnica, ENCB-IPN.

CORRESPONDENCIA: Dr. en C. Sergio I. Alva Estrada. Departamento de Bioquímica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Prof. De Carpio y Plan de Ayala, Colonia Sto. Tomás, 11340, México, D.F.

## Material y Métodos

Para claridad del método fotocolorimétrico que se propone, se describen paso a paso, los procedimientos para la verificación de la precisión y exactitud del sistema de medición y posteriormente el procedimiento realizado para la validación del método.

Se necesita únicamente una solución de dicromato de potasio al 8% en agua destilada, un fotómetro y el material de vidrio que se señala.

### Procedimiento para verificar la precisión de los usuarios y las micropipetas

- En cada uno de 20 tubos de 10 x 75 mm, colocar la solución del dicromato, con la micropipeta que se desee verificar y agua en proporciones de 10  $\mu\text{L}$  por cada mL, respectivamente, y mezclar por inversión. La medición del volumen de agua debe hacerse con el máximo cuidado utilizando una pipeta adecuada para el volumen deseado. (Evitar medir con la parte final de la pipeta.)
- Leer la absorbancia de cada tubo, frente a blanco de agua y a 500 nm de longitud de onda. Asegurarse que el equipo puede medir el volumen utilizado.
- Con las absorbancias obtenidas calcular el CV.
- **Interpretación de resultados:** El CV representa la imprecisión acumulada del usuario y de la pipeta. Si el CV es menor o igual al 2%, entonces el usuario la usa bien y la pipeta funciona correctamente. Si el valor es mayor, la imprecisión puede ser debida a mal manejo de la pipeta, al incorrecto funcionamiento de la misma o a ambos. Entonces se deberá investigar la causa, haciéndolo con más cuidado, con otra pipeta o por otro usuario.
- Si la pipeta es la que tiene imprecisión, tal vez se corrija dándole mantenimiento, pero habrá que verificarla después de efectuarlo. Los instructivos de las pipetas señalan cómo realizarlo e incluyen información para limpieza, lubricación y sustitución de empaques o piezas.

### Procedimiento para verificar la exactitud de las micropipetas

La técnica se basa en la utilización de lo que hemos denominado **estándar relativo**. Este se prepara utilizando múltiplos enormes (para evitar el error) de la misma proporción de 10  $\mu\text{L}$  del dicromato por cada mL de agua.

- Preparar el **estándar relativo** depositar 5 mL de la solución de dicromato y llenar hasta el aforo con agua destilada un matraz de 500 mL.
- Leer la absorbancia (**A**) del **estándar relativo**, simultáneamente con los tubos con los que se determinó la imprecisión.
- Calcular el volumen que la pipeta está midiendo con la fórmula siguiente.

$$\text{VOLUMEN DE LA PIPETA EN } \mu\text{L} = \frac{A \text{ promedio} \times \text{VNP}}{A \text{ del estándar relativo}}$$

La **A promedio** es el valor obtenido durante la verificación de la precisión.

**VNP** es el valor nominal de la pipeta. Por ejemplo, si la pipeta es de volumen fijo entonces VNP es el volumen que especifica el fabricante; si es de volumen variable y se miden 20  $\mu\text{L}$  el VNP = 20, si se miden 50  $\mu\text{L}$  el VNP = 50.

**A del Estándar Relativo** es la absorbancia del estándar relativo.

- Calcular el % de error con la fórmula:

$$\% \text{ Error} = (\text{Vobs} - \text{Vesp}) \times 100 / \text{Vesp}$$

**Vobs** es el volumen de la pipeta, determinado con la primer fórmula y **Vesp** es el valor nominal de la pipeta.

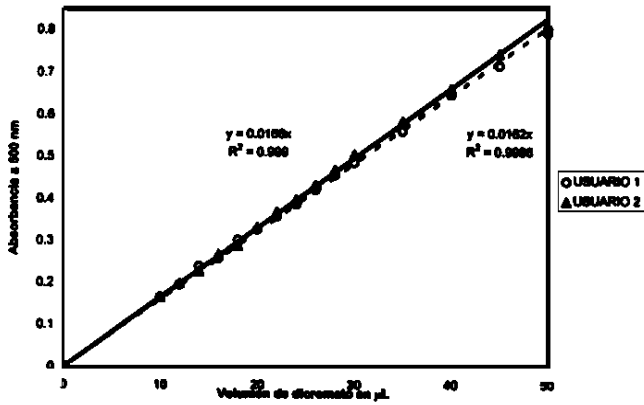
- **Interpretación de resultados:** el % de error de la pipeta debe ser menor de 2%. Si es mayor la pipeta debe calibrarse. Al respecto hay que señalar que algunas pipetas se calibran pero otras no. Esto deberá consultarse en el instructivo del fabricante.

### Validación del método

Para evaluar la linealidad, dos usuarios prepararon una serie de 15 tubos de 10 x 75 mm, a los que se adicionaron 2.0 mL de agua destilada y volúmenes de la solución de dicromato de potasio, desde 10 hasta 50  $\mu\text{L}$ , con intervalos de 2  $\mu\text{L}$  para los primeros 11 tubos y de 5  $\mu\text{L}$  para los 4 siguientes. Se leyó la absorbancia de cada dilución, frente a blanco de agua y a 498 nm, en un fotómetro BM4010. Se construyó una gráfica con los volúmenes utilizados y las absorbancias correspondientes y se calculó la pendiente, el intercepto y el coeficiente de regresión lineal. Multiplicando la absorbancia de cada tubo, por el factor de dilución correspondiente y dividiendo entre 101 (factor de dilución del **estándar relativo**), se calculó la absorbancia que daría cada tubo si se hubiera hecho una dilución equivalente a la del estándar y con los resultados se estableció el CV del procedimiento.

Para evaluar la eficiencia del método fotocolorimétrico, en la determinación del volumen de las micropipetas, dos usuarios realizaron el procedimiento antes descrito y, con los resultados se construyó una gráfica del volumen obtenido contra el esperado. Se calculó la pendiente, el intercepto y los coeficientes de correlación "r" y de determinación "R<sup>2</sup>".

Se comparó la eficiencia del método fotocolorimétrico con la del método gravimétrico (éste se llevó a cabo pesando 20 veces el agua depositada con la pipeta). Con ambos métodos se determinó la precisión y la exactitud de 6 pipetas de 20  $\mu\text{L}$  (o igual volumen en aquéllas de volumen variable), que estaban en uso en diferentes laboratorios. Los resultados de ambos métodos se compararon estadísticamente. Con la prueba "t" de Student se investigó



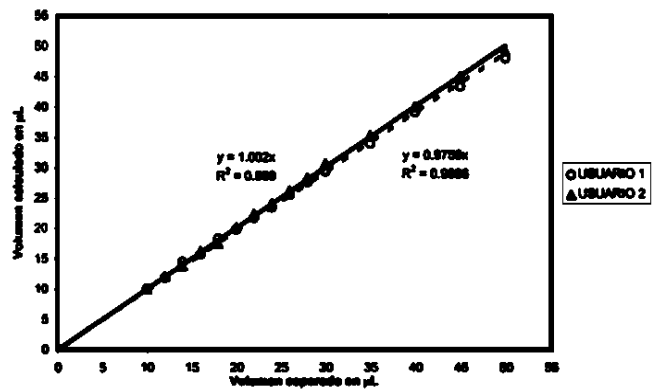
Gráfica 1. Linealidad del método colorimétrico para verificación de micropipetas, se usaron 2 mL de agua por cada volumen de dicromato.

el significado de las diferencias entre los promedios (diferencias en la exactitud), y con la prueba de "F" el de las varianzas (diferencias en la precisión).<sup>(7)</sup>

**Resultados**

En la gráfica 1 se presenta la absorbancia obtenida para cada dilución del dicromato de potasio. La pendiente de la recta fue de 0.0166, el intercepto de "0" y el coeficiente de determinación 0.999.

En la gráfica 2 se relaciona el volumen calculado con el método fotocolorimétrico y el volumen nominal de la pipeta



Gráfica 2. Estudio del valor predictivo del sistema de verificación de la exactitud de las micropipetas.

(volumen esperado). La pendiente de la recta fue de 1.002, el intercepto de "0" y el coeficiente de determinación de 0.999.

En la tabla 1 se presentan los resultados experimentales, obtenidos con los métodos fotocolorimétrico y gravimétrico. Se incluyen los resultados de los análisis estadísticos correspondientes.

**Discusión**

Los datos mostrados en la gráfica 1 sugieren que el fotómetro utilizado, la pipeta y el procedimiento seguido para las diluciones funcionan correctamente, lo que se

Tabla 1. Comparación de los resultados de la verificación de micropipetas con los métodos gravimétrico y fotocolorimétrico

Método Gravimétrico						
	Pipeta 1	Pipeta 2	Pipeta 3	Pipeta 4	Pipeta 5	Pipeta 6
Promedio	17.42	19.48	19.65	19.63	20.47	19.57
D.E.	0.11	0.08	0.08	0.05	0.07	0.12
C.V.	0.65	0.40	0.43	0.25	0.33	0.59
% error	-12.90	-2.60	-1.75	-1.85	2.35	-2.15
Método Fotocolorimétrico						
	Pipeta 1	Pipeta 2	Pipeta 3	Pipeta 4	Pipeta 5	Pipeta 6
Promedio	17.53	19.54	19.72	19.69	20.52	19.55
D.E.	0.22	0.14	0.13	0.21	0.22	0.25
C.V.	1.23	0.74	0.64	1.05	1.07	1.29
% error	-12.35	-2.28	-1.41	-1.56	2.61	-2.25
Resultados de la prueba de "t" de Student						
Probabilidad	0.18	0.24	0.18	0.40	0.48	0.82
Sig. estadístico	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Resultados de la prueba de "F"						
Probabilidad	0.04	0.04	0.12	0.0001	0.001	0.02
Sig. estadístico	S	S	NS	S	S	S

confirma con los datos de la recta ( $R^2 = 0.999$ ,  $b = 0$ ) y del coeficiente de variación del procedimiento que fue de 1.4 por ciento.

Los datos de la gráfica 2 muestran que el método fotocolorimétrico tiene la capacidad de establecer el volumen que mide una pipeta, al menos en el intervalo de 10 a 50  $\mu\text{L}$  ( $R^2 = 0.999$ ).

En la tabla 1 se observa que el método fotocolorimétrico proporciona resultados equivalentes a los del método gravimétrico, ya que al compararlos estadísticamente, no se encontraron diferencias significativas en la exactitud ( $p > 0.05$  en la prueba de "t" de Student), a pesar de que las diferencias en la precisión sí fueron significativas ( $p < 0.05$  en la prueba de F) en 5 de las 6 pipetas estudiadas. La mayor imprecisión observada en el método fotocolorimétrico se explica por tener un mayor número de pasos. Sin embargo, a pesar de que las diferencias son estadísticamente significativas, esto no es así desde un punto de vista práctico, ya que el CV más alto fue de 1.29%, de manera que esto no es un factor limitante y se puede compensar si se considera aceptable un CV de 2% para el método fotocolorimétrico, que es el doble del que se acepta para el método gravimétrico.

En la misma tabla 1 se aprecia que el método fotocolorimétrico, al igual que el gravimétrico, permitió establecer que la pipeta No. 1 tiene un problema importante en su exactitud (error = -12.35%), lo que demuestra que el método propuesto puede ser de utilidad, especialmente en aquellos laboratorios que carecen de balanza analítica, además de que también permite evaluar

la precisión de los usuarios y la precisión de las micropipetas.

Finalmente, conviene recordar que si la pipeta tiene precisión pero carece de exactitud, el problema se compensa si junto con las muestras problema se procesa un estándar, pero que en aquellos métodos en los cuales no hay estándar (enzimas, bilirrubinas y colesterol), el error de la pipeta se sumará a los de otras fuentes de inexactitud.

## Referencias

1. Alva-Estrada SI, Benito-Mercadé MC, Cabañas-Cortés EM, Pizano-Romo F. Programa de evaluación de la calidad entre laboratorios. I. Diagnóstico del funcionamiento de fotómetros. LABORAT-acta 1991;3(2):17-9.
2. Benito-Mercadé MC, Alva-Estrada SI, Guerrero-Andrade R, Gómez ML, Salcedo-Romero R, Cabañas-Cortés EM. Programa de evaluación de la calidad entre laboratorios. III. Estudio del efecto de la calibración sobre la calidad analítica. LABORAT-acta 1991;3(4):19-24.
3. Alva-Estrada SI, Fuentes-Mancilla L, Cabañas-Cortés EM, y Sánchez-Manzano RM. Programa de evaluación de la calidad entre laboratorios. XVII. La calidad en química clínica, dentro de límites. LABORAT-acta 1998;10:31-6.
4. Niño HV: Garantía de calidad en el laboratorio clínico, 1ª edición, Ed. Panamericana, Colombia, 1993, p.183.
5. Salas R y Loría A. Precisión y exactitud de micropipetas automáticas. Rev Invest Clin 1988;40:207-10.
6. Loría A, Salas R. Evaluación de sistemas de pipeteo. II. Precisión y exactitud de vertidores de precisión. 1990; Rev Invest Clin 42:157-60.
7. Loría A. Estadística mínima. II. Los datos de resumen a mediano plazo. LABORAT-acta 1989;1(2):9-14.



LABORAT-acta se une a la pena que embarga  
al Dr. Francisco Durazo Quiroz  
por la pérdida de su amada esposa

MARY LUZ

quien falleció el día 26 de Octubre de 1998.