

# Protocolo de validación para determinaciones en muestras biológicas (sangre y orina) de interés en higiene industrial

MTA/PV - III(2)/98

*Palabras clave:* Agente químico, xenobiótico, metabolitos, sangre, orina, validación.

## Índice

### 0. INTRODUCCIÓN

### 1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

### 2. DEFINICIONES

### 3. MATERIALES

#### 3.1. Reactivos

#### 3.2. Aparatos

### 4. PRUEBAS INTRALABORATORIO

#### 4.1. Selección del método analítico

#### 4.2. Establecimiento de las condiciones que debe reunir la muestra

#### 4.3. Estudio comparativo con materiales de referencia

#### 4.4. Estudio de conservación de las muestras

### 5. REQUISITOS INTRALABORATORIO

### 6. PRUEBAS INTERLABORATORIOS

### 7. INFORME DEL PROCESO DE VALIDACIÓN

### 8. BIBLIOGRAFÍA

---

## 0. INTRODUCCIÓN

La validación de un procedimiento de medida establece, mediante estudios sistemáticos de laboratorio, que las características de dicho procedimiento cumplen las especificaciones relativas al uso previsto de los resultados analíticos. El proceso de validación permite el conocimiento de las características de funcionamiento del método y proporciona un alto grado de confianza en el mismo y en los resultados obtenidos al aplicarlo.

A fin de establecer los procedimientos de medida utilizados para la determinación de la concentración de analitos en muestras biológicas (sangre y orina) es necesario prefiar unos criterios de comportamiento que incluyan, entre otros, los valores máximos del sesgo y de la precisión que se deben conseguir bajo condiciones de laboratorio.

## 1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Este protocolo especifica los requisitos generales de comportamiento que deben cumplir los procedimientos de medida para la determinación de la concentración de analitos en muestras biológicas, incluyendo las condiciones para el transporte y almacenamiento de muestras.



## 2. DEFINICIONES

En este protocolo se utilizan los siguientes términos según las definiciones que se dan a continuación:

### **Agente químico**

Es una sustancia susceptible de producir un efecto adverso para la salud.

### **Exposición (por inhalación)**

Situación en la que el agente químico está presente en el aire inhalado por una persona.

### **Xenobiótico**

Cualquier sustancia con actividad biológica, extraña al organismo y presente en el mismo como consecuencia de una exposición laboral.

### **Valor límite biológico (VLB)**

Es un valor de referencia de la concentración del xenobiótico en un medio biológico, sus metabolitos o un indicador de efecto, propuesto o adoptado como guía para la evaluación del riesgo potencial para la salud en la práctica de la Higiene Industrial.

### **Valor verdadero**

Valor "verdadero" o aceptado es la concentración del xenobiótico, de alguno de sus metabolitos o de algún indicador de efecto, en el material de referencia utilizado para efectuar la validación del método.

### **Sesgo**

Es la desviación o diferencia de los resultados obtenidos aplicando un procedimiento de medida con respecto al valor aceptado como referencia o valor verdadero. El sesgo es una expresión de la inexactitud del método y representa el error sistemático total.

### **Precisión**

Es el grado de concordancia entre los resultados obtenidos aplicando el método repetidas veces, bajo condiciones determinadas. La precisión sólo depende de la distribución de errores aleatorios.

### **Intervalo de medida**

Es el intervalo de concentraciones para las cuales el sesgo y la precisión de un procedimiento de medida están dentro de los límites especificados.

### **Procedimiento de medida**

Procedimiento utilizado para la determinación del analito en un medio biológico, incluyendo el almacenamiento y transporte de la muestra.

### **Validación**

Es el proceso para evaluar las características de funcionamiento de un procedimiento de medida y verificar que se cumplen los criterios exigidos a los datos.

### **Repetibilidad (r)**

#### a. Cualitativamente

Es el grado de concordancia entre resultados sucesivos obtenidos con el mismo método sobre una materia idéntica sometida al ensayo, en las mismas condiciones (siempre el mismo operador, igual aparato, igual laboratorio y en pequeños intervalos de tiempo).

#### b. Cuantitativamente

Es el valor por debajo del cual está situado, con una probabilidad especificada, el valor absoluto de la diferencia entre dos resultados individuales obtenidos en las condiciones anteriormente expuestas.

En ausencia de otra indicación se entenderá que la probabilidad es del 95%.

### Reproducibilidad (R)

#### a. Cualitativamente

Es el grado de concordancia entre dos resultados individuales obtenidos con el mismo método sobre una materia idéntica sometida al ensayo, pero en condiciones diferentes (operadores distintos, aparatos diferentes, distintos laboratorios y/o épocas diferentes).

#### b. Cuantitativamente

Es el valor por debajo del cual está situado, con una probabilidad especificada, el valor absoluto de la diferencia entre dos resultados individuales obtenidos en las condiciones anteriormente expuestas.

En ausencia de otra indicación se entenderá que la probabilidad es del 95%.

### Límite de detección

Es la menor cantidad de analito que puede ser detectada y diferenciada de un blanco, pero no necesariamente cuantificada con un nivel aceptable de exactitud y precisión.

### Límite de cuantificación

Es la cantidad o concentración mínima que puede determinarse con un nivel aceptable de exactitud y precisión.

### Incertidumbre de la medida

Estimación que caracteriza el intervalo de valores en el que se sitúa generalmente, con una alta probabilidad, el valor verdadero de la magnitud medida.

La incertidumbre de la medida incluye, en general, varios componentes. Algunos pueden estimarse a partir de la distribución estadística de los resultados de una serie de mediciones y pueden caracterizarse por la desviación típica muestral. La estimación de otros componentes solamente puede basarse en la experiencia o en otras informaciones.

### Incertidumbre global

Es una cantidad utilizada para caracterizar, como un todo, la incertidumbre del resultado dado por un equipo o un procedimiento de medida. Se expresa, en porcentaje, por una combinación del sesgo y de la precisión, generalmente de acuerdo con la fórmula:

$$\frac{|\bar{X} - x_{\text{ref}}| + 2s}{x_{\text{ref}}} \times 100$$

donde:

$\bar{X}$  es el valor medio de los resultados de un número n de mediciones

$x_{\text{ref}}$  es el valor de referencia aceptado o verdadero

s es la desviación típica de las n mediciones

### Material de referencia (MR)

Es un material o sustancia en el cual uno o más valores de sus propiedades son suficientemente homogéneos y están bien definidos para permitir utilizarlos para la calibración de un instrumento o la evaluación de un procedimiento de medida.

### Material de referencia certificado (MRC)

Es un material de referencia acompañado de un certificado, en el cual uno o más valores de sus propiedades están certificados por un procedimiento que establece su trazabilidad con una realización exacta de la unidad en la que se expresan los valores de la propiedad y para la cual cada valor certificado se acompaña de una incertidumbre con la indicación de un nivel de confianza.

### 3. MATERIALES

#### 3.1. Reactivos

Todos los reactivos deben ser de calidad analítica.

#### 3.2. Aparatos

Los equipos e instrumentos necesarios para efectuar las determinaciones de interés.

### 4. PRUEBAS INTRALABORATORIO

#### 4.1. Selección del método analítico

La selección del método analítico debe basarse en factores tales como:

##### 4.1.1. Selectividad

Capacidad de un método analítico para determinar únicamente los componentes que se pretenden medir.

##### 4.1.2. Sensibilidad

Es la pendiente de la recta de calibración que se obtiene cuando el resultado (o señal) de la medida o una función de la misma se representa frente a la cantidad o concentración del analito.

##### 4.1.3. Correspondencia biunívoca

Cada procedimiento de medida debe ser biunívoco, en el intervalo especificado de medida, esto es: que una y sólo una concentración debe corresponder al valor determinado analíticamente y viceversa.

##### 4.1.4. Linealidad en el intervalo de aplicación

La pendiente de la recta de calibración debe ser constante en todo el intervalo de aplicación del procedimiento de medida. El límite inferior de dicho intervalo vendrá determinado por el valor obtenido para el límite de cuantificación del método. El límite superior del intervalo estará condicionado, en general, por la pérdida de linealidad en la curva de calibración.

#### 4.2. Establecimiento de las condiciones que debe reunir la muestra

Las condiciones referentes al tipo de muestra (sangre total, suero, orina, etc.), momento del día para la recogida de la muestra, necesidad o no de aditivos para su adecuada conservación, condiciones de transporte y tiempo máximo de conservación vendrán determinadas por el tipo de indicador biológico escogido, el método de análisis seleccionado y los resultados obtenidos en las pruebas experimentales para determinar las condiciones de estabilidad y conservación

#### 4.3. Estudio comparativo con materiales de referencia

En los sistemas de adsorción/desorción uno de los factores más importantes a tener en cuenta es el procedimiento de desorción, que se deberá elegir en función del procedimiento de medida objeto de la validación. Dicho procedimiento de desorción podrá ser:

Para el cálculo del sesgo de un método analítico deben ser utilizados Materiales de Referencia Certificados (MRC). Cuando no se disponga de ellos y se utilicen otros Materiales de Referencia (MR) como los patrones comerciales o muestras procedentes de Controles de Calidad Externos de concentración garantizada, el valor del sesgo calculado a partir de ellos se considerará únicamente como indicativo.

Los ensayos se efectuarán, preferentemente, a tres niveles de concentración que cubran todo el intervalo de aplicación del método, analizándose seis muestras por cada concentración estudiada.

Concentración	n° muestras
---------------	-------------

Nivel I	6
Nivel II	6
Nivel III	6

Para cada uno de los niveles ensayados deberán cumplirse los requisitos de sesgo y precisión establecidos en el [apartado 5](#).

#### 4.4. Estudio de conservación de las muestras

Los estudios de estabilidad y conservación deben realizarse sobre muestras reales. Preferentemente se ensayarán dos niveles de concentración próximos a los extremos superior e inferior del intervalo de aplicación del método.

Por cada nivel de concentración la muestra se dividirá en 18 alícuotas que se analizarán siguiendo el siguiente esquema:

Tiempo del Análisis	Concentración	
	Nivel A	Nivel B
Inmediato	6	6
48 horas (Tª ambiente)	6	6
14 días (4 °C)	6	6

La conservación de las muestras es un factor crítico en la evaluación del método. Se considera que no existen problemas si los resultados obtenidos en esta experiencia, en los diferentes tiempos de análisis ensayados, no difieren de los obtenidos con las muestras analizadas inmediatamente en más de un 10%.

En función de los resultados obtenidos se establecerán las condiciones de transporte y almacenamiento de las muestras.

Dada la naturaleza de las muestras biológicas, el estudio de conservación no tiene por qué ajustarse estrictamente al aquí indicado, sino que en cada caso y siempre en función de las características de cada muestra y analito se establecerán las condiciones más idóneas para el transporte y la conservación de las muestras.

## 5. REQUISITOS INTRALABORATORIO

El método de análisis deberá cumplir los siguientes requisitos en todo su intervalo de aplicación:

El tiempo de almacenamiento admitido será el tiempo máximo ensayado en el que la diferencia con los resultados de las muestras analizadas de forma inmediata sea < 10%.

La desviación típica relativa para cada nivel de concentración será < 10%.

El sesgo relativo expresado como  $100 \cdot | \bar{X} - x_{ref} | / x_{ref}$  para cada concentración y condición ensayada será < 10% siendo  $x_{ref}$  el valor verdadero o aceptado y  $\bar{X}$  el valor medio de los resultados obtenidos para cada concentración en [4.3](#).

## 6. PRUEBAS INTERLABORATORIOS

Los métodos que cumplan los requisitos indicados en el [apartado 5](#), pueden ser sometidos a una prueba interlaboratorios con el fin de determinar su repetibilidad y reproducibilidad.

Antes del desarrollo de la prueba, los laboratorios participantes en la misma deberán disponer de la descripción detallada del método de toma de muestra y análisis y seguir las instrucciones del mismo a la hora de realizar los análisis.

El esquema mínimo a seguir para el desarrollo de una prueba interlaboratorios será:

- número mínimo de laboratorios participantes: 8
- número mínimo de niveles de concentración: 2
- número de muestras por nivel de concentración:  $2 < n < 6$ ,

El análisis estadístico de los resultados y el cálculo de la repetibilidad y reproducibilidad se realizará de acuerdo con la norma ISO 5725.

## 7. INFORME DEL PROCESO DE VALIDACIÓN

El informe deberá incluir al menos la siguiente información:

- a. Descripción completa de la muestra, especificando.
  - o Tiempo y condiciones de muestreo.
  - o Cantidad mínima necesaria.
  - o Instrumental y recipientes adecuados para la toma y conservación de las muestras.
  - o Aditivos cuando sean necesarios.
  - o Precauciones a tomar una vez recogida la muestra (por ejemplo: tiempo y temperatura de conservación).
- b. Descripción completa del método analítico.
- c. Concentraciones ensayadas.
- d. Valores obtenidos en los ensayos realizados.
- e. Valores calculados para la precisión, sesgo, r y R para cada concentración.
- f. Justificación técnica de la omisión de algún ensayo.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Directiva 98/24/CE del Consejo, de 7-4-1998, relativa a la protección de la salud y la seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo.

ISO 5725 : 1994 (E). Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results.

Para cualquier observación o sugerencia en relación con este Método puede dirigirse al

**Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo**

**Centro Nacional de Verificación de Maquinaria**

Camino de la Dinamita, s/n Monte Basatxu-Cruces - 48903 BARACALDO (VIZCAYA)

Tfn. 944 990 211 - 944 990 543 Fax 944 990 678

Correo electrónico.- [cnvminsht@mtas.es](mailto:cnvminsht@mtas.es)