

**IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA POR ESPECTROFOTOMETRÍA
UV-VISIBLE, PARA EL ANÁLISIS DE QUÍMICA SANGUÍNEA EN EL CENTRO
INTEGRAL DE DIAGNÓSTICO AGROPECUARIO DE RISARALDA (CIDAR),
DEPENDENCIA DE LA SECRETARÍA DE DESARROLLO AGROPECUARIO DE
LA GOBERNACIÓN DE RISARALDA.**

JULIANA HENAO MARÍN.

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA

FACULTAD DE TECNOLOGÍAS

TECNOLOGÍA QUÍMICA

PEREIRA

2015

**IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA POR ESPECTROFOTOMETRÍA
UV-VISIBLE, PARA EL ANÁLISIS DE QUÍMICA SANGUÍNEA EN EL CENTRO
INTEGRAL DE DIAGNÓSTICO AGROPECUARIO DE RISARALDA (CIDAR),
DEPENDENCIA DE LA SECRETARÍA DE DESARROLLO AGROPECUARIO DE
LA GOBERNACIÓN DE RISARALDA.**

JULIANA HENAO MARÍN.

TRABAJO DE GRADO

Requisito final para optar el título de Tecnólogo Químico.

DIRECTOR

EDISON AUGUSTO LONDOÑO SANCHEZ.

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA

FACULTAD DE TECNOLOGÍAS

TECNOLOGÍA QUÍMICA

PEREIRA

2015

NOTA DE ACEPTACIÓN DE TRABAJO DE GRADO.

**IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA POR ESPECTROFOTOMETRÍA
UV-VISIBLE, PARA EL ANÁLISIS DE QUÍMICA SANGUÍNEA EN EL CENTRO
INTEGRAL DE DIAGNÓSTICO AGROPECUARIO DE RISARALDA (CIDAR),
DEPENDENCIA DE LA SECRETARÍA DE DESARROLLO AGROPECUARIO DE
LA GOBERNACIÓN DE RISARALDA.**

Presentado por:

JULIANA HENAO MARÍN.

Los suscritos Director y Jurado del presente Trabajo de Grado, una vez realizada la versión escrita y presenciada la sustentación oral, decidimos otorgar:

La nota de _____

Con la connotación _____

Para constancia, firmamos en la ciudad de Pereira hoy:

Director:

Edison Augusto Londoño Sánchez _____

Jurados:

Firma: _____

DEDICATORIA.

*A mis padres Edgar Henao López y Eloína Marín Colorado, compañeros de vida
y cómplices de sueños.*

AGRADECIMIENTOS.

Al Centro Integral de Diagnostico Agropecuario-CIDAR.

Al profesor Edison Augusto Londoño Sánchez, director de este trabajo, por compartir sus conocimientos, brindar su apoyo y su experiencia para hacer posible la realización de este trabajo.

A Carlos Albeiro León, Pamela Cano, Doctora Martha Liliana Vallejo e Isleny Marín, por el apoyo brindado durante el desarrollo de este trabajo.

A todos mis amigos y compañeros que me acompañaron durante este proceso.

TABLA DE CONTENIDO.

1	INTRODUCCIÓN.....	13
2	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
3	JUSTIFICACIÓN.....	15
4	OBJETIVOS.....	17
4.1	GENERAL.....	17
4.2	ESPECÍFICOS.....	17
5	MARCO TEÓRICO.....	18
5.1	QUÍMICA SANGUÍNEA.....	18
5.2	LABORATORIO CLÍNICO VETERINARIO.....	24
5.3	TÉCNICAS PARA LA MEDICIÓN EN QUÍMICA SANGUÍNEA: FOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA-VISIBLE (FOTOCOLORIMETRÍA).....	26
5.4	PARÁMETROS DE CALIDAD ANALÍTICA.....	31
6	MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
6.1	DISEÑO METODOLÓGICO.....	35
6.2	MUESTRAS DE SUERO SANGUÍNEO.....	35
6.3	EQUIPO.....	38
6.4	METODOLOGÍA.....	40
7	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	57
7.1	VARIACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES.....	57
7.2	ELECCIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES ADECUADAS.....	65
7.3	PARÁMETROS DE CALIDAD ANALÍTICA.....	65
8	CONCLUSIONES.....	79
9	BIBLIOGRAFÍA.....	80
	ANEXO A.....	82

INDICE DE TABLAS.

Tabla 1. VALORES DE REFERENCIA DE PERFIL BIOQUIMICO PARA EQUINOS, CANINOS Y FELINOS.....	23
Tabla 2. MARCO NORMATIVO COLOMBIANO PARA ACTIVIDADES DE INSPECCIÓN, VIGILANCIA Y CONTROL DE ESTABLECIMIENTOS VETERINARIOS Y AFINES.	25
Tabla 3. CRITERIOS ANALITICOS PARA SELECCIONAR MÉTODOS ANALÍTICOS....	32
Tabla 4. PARÁMETROS DE CALIDAD DE LA PRECISIÓN.	32
Tabla 5. DISEÑO METODOLÓGICO.....	35
Tabla 6. VALORES DE REFERENCIA DE LOS COMPONENTES EN EL SUERO CALIBRADOR DE BIOQUÍMICA, TOMADOS DEL INSERTO QUE PROPORCIONA EL PROVEEDOR.....	36
Tabla 7. VALORES DE REFERENCIA DE LOS COMPONENTES EN EL SUERO CONTROL DE BIOQUÍMICA, TOMADOS DEL INSERTO QUE PROPORCIONAR EL PROVEEDOR.....	37
Tabla 8. ESQUEMA DE LAS VARIACIONES DE LOS PARAMETROS PARA ALT/GPT, AST/GOT Y CK.....	49
Tabla 9. ESQUEMA DE LAS VARIACIONES DE LOS PARAMETROS PARA CREATININA.....	50
Tabla 10. ESQUEMA DE LAS VARIACIONES DE LOS PARAMETROS PARA COLESTEROL, TRIGLICERIDOS Y GLUCOSA.....	50
Tabla 11. ESQUEMA DE LAS VARIACIONES DE LOS PARAMETROS PARA UREA/BUN.....	51
Tabla 12. ESQUEMA DE LAS VARIACIONES DE LOS PARAMETROS PARA PROTEINA TOTAL.....	51
Tabla 13. RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA VARIACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES EN LA MEDICIÓN DE ALT/GPT.....	57
Tabla 14. RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA VARIACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES EN LA MEDICIÓN DE AST/GOT.....	58

Tabla 15. RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA VARIACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES EN LA MEDICIÓN DE CK.....	58
Tabla 16. RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA VARIACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES EN LA MEDICIÓN DE CREATININA.	59
Tabla 17. RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA VARIACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES EN LA MEDICIÓN DE GLUCOSA.	60
Tabla 18. RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA VARIACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES EN LA MEDICIÓN DE COLESTEROL.....	61
Tabla 19. RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA VARIACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES EN LA MEDICIÓN DE TRIGLICÉRIDOS.	62
Tabla 20. RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA VARIACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES EN LA MEDICIÓN DE UREA/BUN.	63
Tabla 21. RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA VARIACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES EN LA MEDICIÓN DE PROTEÍNA TOTAL.	64
Tabla 22. ELECCIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES ADECUADAS PARA CADA ANALITO CON BASE EN LA DIFERENCIA PORCENTUAL DEL VALOR OBTENIDO EN CADA EXPERIEMIENTO CON RESPECTO AL VALOR REAL DEL ANALITO EN LA MUESTRA.....	65
Tabla 23. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD DE LA PRECISIÓN PARA CADA UNO DE LOS MÉTODOS.	66
Tabla 24. DETERMINACIÓN DEL SESGO PARA CADA UNO DE LOS MÉTODOS.....	68
Tabla 25. CONCENTRACIONES Y ABSORBANCIAS CORRESPONDIENTES A LOS ANALITOS EN LA MUESTRA	69
Tabla 26. DATOS PARA CONSTRIUIR LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE ALT/GPT....	69
Tabla 27. DATOS PARA CONSTRIUIR LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE AST/GOT. ...	70
Tabla 28. DATOS PARA CONSTRIUIR LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE CK.....	71
Tabla 29. DATOS PARA CONSTRIUIR LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE CREATININA.	71
Tabla 30. DATOS PARA CONSTRIUIR LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE GLUCOSA.	72

Tabla 31. DATOS PARA CONSTRUIR LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE COLESTEROL.....	72
Tabla 32. DATOS PARA CONSTRUIR LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS.....	73
Tabla 33. DATOS PARA REALIZAR LA REGRESIÓN LINEAL EN LA CURVA DE CALIBRACION DE TRIGLICÉRIDOS.....	73
Tabla 34. DATOS PARA CONSTRUIR LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS OBTENIDOS MEDIANTE AJUSTE POR EL MÉTODO DE MÍNIMOS CUADRADOS.....	74
Tabla 35. DATOS PARA CONSTRUIR LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE UREA/BUN.	75
Tabla 36. DATOS PARA REALIZAR LA REGRESIÓN LINEAL PARA LA CURVA DE CALIBRACION DE UREA/BUN.....	75
Tabla 37. DATOS PARA CONSTRUIR LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE UREA/BUN OBTENIDOS MEDIANTE AJUSTE POR EL MÉTODO DE MÍNIMOS CUADRADOS.....	76
Tabla 38. DATOS PARA CONSTRUIR LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL.....	76
Tabla 39. SENSIBILIDAD DE CALIBRACION PARA CADA UNO DE LOS MÉTODOS DE MEDICIÓN.....	77
Tabla 40. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACION PARA CADA UNO DE LOS MÉTODOS DE MEDICIÓN.....	78

INDICE DE ILUSTRACIONES.

Ilustración 1. RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA (R.E.M) POLARIZADA EN EL PLANO QUE SE PROPAGA.	27
Ilustración 2. ESPECTRO ELECTROMAGNÉTICO.	27
Ilustración 3. ATENUACION DE LA R.E.M AL PASAR POR UN MEDIO ABSORBENTE.	28
Ilustración 4. DIAGRAMA DE BLOQUES QUE ILUSTRA LAS PARTES QUE CONFORMAN UN ESPECTROFOTOMETRO SENCILLO.....	31
Ilustración 5. EQUIPO EMPLEADO: BTS-350 ANALIZADOR SEMIAUTOMATIZADO. .	38
Ilustración 6. REACCIONES ASOCIADAS AL MÉTODO IFFC PARA DETERMINACIÓN DE AL/GPT. TOMADO DE INSTRUCTIVO PROPORCIONADO POR EL PROVEEDOR.	41
Ilustración 7. REACCIONES ASOCIADAS AL MÉTODO IFFC PARA DETERMINACIÓN DE ASTGOT. TOMADO DE INSTRUCTIVO PROPORCIONADO POR EL PROVEEDOR.	42
Ilustración 8. REACCIONES ASOCIADAS AL MÉTODO OXIDASA/PEROXIDASA PARA DETERMINACIÓN DE COLESTEROL. TOMADO DEL INSTRUCTIVO PROPORCIONADO POR EL PROVEEDOR.	43
Ilustración 9. REACCIONES ASOCIADAS AL MÉTODO IFCC PARA DETERMINACIÓN DE CK. TOMADO DEL INSTRUCTIVO PROPORCIONADO POR EL PROVEEDOR.	45
Ilustración 10. REACCIÓN ASOCIADA AL MÉTODO DEL PICRATO ALCALINO PARA DETERMINACIÓN DE CREATININA. TOMADO DEL INSTRUCTIVO PROPORCIONADO POR EL PROVEEDOR.....	45
Ilustración 11. REACCIONES ASOCIADAS AL MÉTODO GLUCOSA-OXIDASA-PEROXIDASA PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA. TOMADO DEL INSTRUCTIVO PROPORCIONADO POR EL PROVEEDOR.	46
Ilustración 12. REACCIÓN ASOCIADA AL MÉTODO DE BIURET PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL. TOMADO DEL INSTRUCTIVO PROPORCIONADO POR EL PROVEEDOR.....	47

Ilustración 13. REACCIONES ASOCIADAS AL MÉTODO GLICEROL-FOSFATO- OXIDASA/PEROXIDASA PARA LA DETERMINACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS. TOMADO DEL INSTRUCTIVO PROPORCIONADO POR EL PROVEEDOR.	48
Ilustración 14. REACCIONES ASOCIADAS AL MÉTODO DE LA UREASA-SALICILATO PARA LA DETERMINACIÓN DE UREA/BUN. TOMADO DEL INSTRUCTIVO PROPORCIONADO POR EL PROVEEDOR.	49
Ilustración 15. DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCEDIMIENTO PARA MEDIR ALT/GPT, AST/GOT Y CK.....	54
Ilustración 16. DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCEDIMIENTO PARA MEDIR CREATININA.....	54
Ilustración 17. DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCEDIMIENTO PARA MEDIR GLUCOSA, COLESTEROL Y TRIGLICÉRIDOS.....	55
Ilustración 18. DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCEDIMIENTO PARA MEDIR UREA/BUN.....	55
Ilustración 19. DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCEDIMIENTO PARA MEDIR PROTEÍNA TOTAL.....	56

INDICE DE GRÁFICAS.

Gráfica 1. GRAFICA DE DESVIACION ESTANDAR ABSOLUTA CORRESPONDIENTES A CADA MÉTODO DE MEDICIÓN EMPLEANDO EL SUERO CONTROL DE BIOQUIMICA.....	67
Gráfica 2. GRAFICA DE SESGO CORRESPONDIENTES A CADA MÉTODO DE MEDICIÓN.....	68
Gráfica 3. CURVA DE CALIBRACION PARA ALT/GPT.....	70
Gráfica 4. CURVA DE CALIBRACION PARA AST/GOT.....	70
Gráfica 5. CURVA DE CALIBRACION PARA CK.....	71
Gráfica 6. CURVA DE CALIBRACION PARA CREATININA.....	71
Gráfica 7. CURVA DE CALIBRACION PARA GLUCOSA.....	72
Gráfica 8. CURVA DE CALIBRACION PARA COLESTEROL.....	72
Gráfica 9. CURVA DE CALIBRACION PARA TRIGLICÉRIDOS.....	73
Gráfica 10. CURVA DE CALIBRACION PARA TRIGLICÉRIDOS OBTENIDA MEDIANTE AJUSTE POR EL MÉTODO DE MÍNIMOS CUADRADOS.....	74
Gráfica 11. CURVA DE CALIBRACION PARA UREA/BUN.....	75
Gráfica 12. CURVA DE CALIBRACION PARA UREA/BUN OBTENIDA MEDIANTE AJUSTE POR EL MÉTODO DE MÍNIMOS CUADRADOS.....	76
Gráfica 13. CURVA DE CALIBRACION PARA PROTEINA TOTAL.....	77

1 INTRODUCCIÓN.

En los últimos años, el aumento en el uso y el mayor conocimiento de la patología clínica, nos ha llevado a una detección más precisa de posibles enfermedades.¹

El área de Química Sanguínea tiene gran importancia en esta aplicación porque ofrece información adicional al veterinario para realizar un diagnóstico más preciso que conducirá al tratamiento específico, es decir, al tratamiento de la causa determinante de la enfermedad, en lugar de un tratamiento exclusivamente de los síntomas de ésta.²

Actualmente existe un gran número de pruebas Bioquímicas, especialmente útiles en los estudios clínicos y es claro que los mayores crecimientos y retos en patología clínica, serán del área de la química.²

En los laboratorios clínicos, el establecimiento de programas de garantía de calidad ha sido ampliamente reconocido, cuya finalidad primordial es la obtención de resultados fidedignos, oportunos y de igual forma valiosos, no sólo para el individuo sino también para la comunidad.³

Teniendo en cuenta lo anterior, se llevó a cabo este trabajo con el objetivo de implementar una metodología de análisis para el área de Química Sanguínea en el Centro Integral de Diagnóstico Agropecuario-CIDAR; esta metodología busca garantizar la confiabilidad de los resultados emitidos por el laboratorio y facilitar la tarea del veterinario a la hora de proporcionar un diagnóstico con base en los análisis prácticos realizados.

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Uno de los servicios que pretende prestar el **Centro Integral de Diagnóstico Agropecuario de Risaralda** - CIDAR, es el análisis de química sanguínea de suero sanguíneo en caninos, felinos, equinos y bovinos, en miras a reconocer, localizar y diferenciar de forma segura una enfermedad o poner de manifiesto alguna condición anormal que permanece oculta; sin embargo, dicho *Centro* no cuenta con una metodología específica para este tipo de análisis que realiza; algunas determinación son: Creatinina, Colesterol, Urea, Proteína Total, Glucosa, Alanina Aminotransferasa (ALT-GPT), Triglicéridos, Aspartato Aminotransferasa (AST-GOT) y Creatina Quinasa (CK).

Situación problema: la necesidad del CIDAR de la Gobernación de Risaralda, de implementar una metodología específica para el análisis de Química Sanguínea, que garantice la emisión de resultados confiables y que faciliten el diagnóstico, permitiendo así, ampliar la oferta de servicios que presta el Centro.

Formulación general del problema: ¿Cuáles son los procedimientos necesarios para implementar la metodología de análisis adecuada para el área de Química Sanguínea?

Formulación específica del problema: ¿Qué es Química Sanguínea? ¿Cuáles son las técnicas de medición de los componentes de la Química Sanguínea? ¿Con qué equipo cuenta el CIDAR para realizar los análisis? ¿En qué se fundamentan los métodos a implementar? ¿Cuáles son las condiciones experimentales adecuadas para realizar las mediciones? ¿Qué características avalan la calidad de las mediciones?

3 JUSTIFICACIÓN.

En la actualidad, se hace evidente la importancia del estudio y caracterización de la patología clínica en animales domésticos, la cual conlleva a una detección más precisa de una posible enfermedad, alteración o trastorno metabólico. Esta amplia gama de análisis se puede determinar a través de pruebas de laboratorio clínico, denominado “*pruebas de diagnóstico clínico*”.

Los laboratorios de diagnóstico clínico deben aplicar una acreditación de calidad, como por ejemplo la NTC-ISO/IEC 17025:2005 (Requisitos Generales para la Competencia de Laboratorios de Prueba y Calibración) y además deben demostrar:

- Validación y procedimientos aceptables para los equipos y las pruebas.
- Procedimientos óptimos para identificar y reducir los errores técnicos y de interpretación.
- Formación adecuada del equipo de trabajo y educación continua para mantener las aptitudes necesarias.
- Procedimientos que aseguren que el servicio de calidad prometido se mantiene.
- Documentación adecuada que pruebe que todo lo mencionado se realiza.¹

La estandarización de análisis que se realiza en un Centro de Diagnóstico Clínico garantiza la producción de resultados confiables, reproducibles y asegura que la información proporcionada sea válida.

El **Centro Integral de Diagnóstico Agropecuario de Risaralda -CIDAR-** se encuentra registrado como *Laboratorio de Diagnóstico Veterinario* ante el Instituto Colombiano Agropecuario –ICA-, mediante Resolución No 000076 del 23 de enero de 2012, con una vigencia de cinco (5) años y es una organización comprometida con el desarrollo técnico, tecnológico y económico de los proyectos agrícolas y pecuarios de la comunidad risaraldense, realizando análisis de apoyo veterinario y zoonosis, análisis de suelos, agua veterinaria, leche, microbiología animal y agrícola. Esta oferta de servicios que proporciona el **CIDAR** busca beneficiar los empresarios del campo ofreciendo muy bajos precios y costos en los análisis.

El **CIDAR** actualmente no presta servicios de análisis de Química Sanguínea, entendida esta, como el conjunto de exámenes de laboratorio clínico que

proporciona información sobre el metabolismo del organismo animal, mediante la medición y el reporte de componentes químicos disueltos en la sangre, como lo son triglicéridos, glucosa, colesterol, entre otros. El hecho de no prestar este servicio representa una falencia en el diagnóstico clínico de algunas enfermedades de interés general en el ámbito veterinario; por lo cual, este Laboratorio en busca de ampliar su portafolio de servicios y de garantizar el correcto desempeño de las pruebas clínicas, pretende estandarizar metodologías analíticas para la determinación de Creatinina, Colesterol, Urea, Proteína Total, Glucosa, Alanina Aminotransferasa (ALT-GPT), Triglicéridos, Aspartato aminotransferasa (AST-GOT) y Creatina Quinasa (CK).

4 OBJETIVOS.

4.1 GENERAL.

Implementar una metodología para la medición de Creatinina, Colesterol, Urea, Proteína Total, Glucosa, Alanina Aminotransferasa (ALT-GPT), Triglicéridos, Aspartato Aminotransferasa (AST-GOT) y Creatina Quinasa (CK), en muestras de suero sanguíneo de bovinos, equinos, caninos y felinos en el Centro Integral de Diagnóstico Agropecuario de Risaralda – CIDAR.

4.2 ESPECÍFICOS.

4.2.1 Estudiar la documentación requerida para el correcto desempeño de los métodos fotocolorimétricos

- Picrato Alcalino para la determinación de Creatinina.
- Oxidasa-Peróxidasa para la determinación de Colesterol.
- Ureasa-Salicilato para la determinación de Urea.
- Biuret para la determinación de proteína total.
- Glucosa-Oxidasa-Peróxidasa para la determinación de glucosa.
- Glicerol-Fosfato-Oxidasa Peroxidasa para la determinación de Triglicéridos.
- Método IFCC para la determinación de ALT-GPT, AST-GOT y C.K.

4.2.2 Determinar los criterios de calidad analítica de los métodos fotométricos, tales como precisión, sesgo, sensibilidad, límite de detección y límite de cuantificación.

4.2.3 Elaborar y digitar el Manual de Operación correspondiente, indicando las condiciones adecuadas de Laboratorio Clínico para realizar cada análisis, con base en la metodología implementada.

5 MARCO TEÓRICO.

5.1 QUÍMICA SANGUÍNEA.

En los últimos años ha aumentado considerablemente el interés de la aplicación de los análisis clínicos veterinarios en el diagnóstico de patologías en animales. El área de Química Sanguínea tiene gran importancia en esta aplicación porque ofrece información adicional al veterinario para realizar un diagnóstico más preciso que conducirá al tratamiento específico, es decir, al tratamiento de la causa determinante de la enfermedad, en lugar de un tratamiento exclusivamente de los síntomas de ésta.²

Actualmente existe un gran número de pruebas Bioquímicas especialmente útiles en los estudios clínicos y, es claro que los mayores crecimientos y retos en patología clínica, serán del área de la química.²

Los resultados de las pruebas se interpretan en comparación con los valores de referencia obtenidos de un grupo de animales sanos y con conocimiento de cómo las enfermedades pueden alterarlos.¹

Las pruebas bioquímicas se pueden realizar tanto en suero como en plasma¹ pero se recomienda trabajar con suero porque este se hemoliza menos que el plasma; además, no contiene anticoagulantes, los cuales pueden interferir en las determinaciones que se vayan hacer o pueden extraer el agua de las células sanguíneas originando la dilución de los constituyentes celulares.²

Un componente importante de la analítica sanguínea es la determinación de numerosos parámetros bioquímicos; es decir, la concentración de diversas sustancias químicas de naturaleza celular o metabólica, transportadas por la sangre en un momento determinado⁴. Estos parámetros a su vez, juegan un papel importante en el momento del análisis e interpretación de resultados y su determinación sirve en diferentes situaciones, tales como:

- Confirmar la sospecha diagnóstica en un organismo sintomático.
- Controlar la respuesta de parámetros celulares alterados a través de un tratamiento médico.

- Diagnosticar precozmente organismos asintomáticos, pero que pueden tener algún factor de riesgo para diferentes enfermedades. ⁴

5.1.1 COMPONENTES.

- **Alanina aminotransferasa (ALT/GPT).**

Es una enzima citosólica que se encuentra en los hepatocitos a concentraciones 10000 veces más altas que la concentración sérica normal. La medición de su liberación en suero se considera la prueba de elección para detectar daño hepatocelular, ya que tiene una elevada sensibilidad de detección. ¹

La enzima se encuentra en el hialoplasma de todas las células y existe una relación lineal entre la GPT hepática y el peso del organismo animal. Siendo este el caso, la determinación de GPT es casi específica del hígado de caninos y felinos, mientras que es de escaso o de ningún valor en las enfermedades de bovinos y equinos. Es una enzima muy estable en el tiempo, y en estado de congelación se conserva largo tiempo. La ictericia no genera interferencias en la determinación de la enzima, pero debe evitarse la hemólisis. Las enfermedades hepáticas que producen niveles elevados de GPT comprenden neoplasias malignas, cirrosis y hepatitis, incluyendo la que se produce en el perro por el virus de la hepatitis canina infecciosa (HCI). ²

- **Aspartato aminotransferasa (AST/GOT).**

La transaminasa GOT es una enzima que está presente en casi todos los órganos, principalmente en el hígado, corazón y músculos. Se encuentra en el interior de las células, se localiza en un 80% en las mitocondrias del hepatocito y un 20% en el citoplasma y su aumento en sangre significa que ha habido destrucción celular. ⁵

Esta enzima hialoplásmica se encuentra en la mayoría de las células del cuerpo; la mayor concentración esta en las fibras musculares. Su valoración es muy útil en animales grandes como indicación de lesión muscular o necrosis hepática. La enzima se eleva considerablemente en miopatías por exceso de ejercicio físico en equinos, distrofia muscular aviar, y en la enfermedad de los músculos blandos. ²

- **Creatina quinasa (CK).**

La determinación de una enzima específica del músculo como la creatina quinasa permite identificar si se trata de una lesión muscular.

- **Creatinina.**

Es un producto de degradación de la creatina, una parte importante del músculo ⁵. La Creatinina está en el organismo animal principalmente en forma de fosfato de alta energía (Adenosín Trifosfato ATP). En animales jóvenes de crecimiento se encuentra en mayores cantidades. La creatinina es una sustancia muy difusible y distribuida de manera uniforme en el agua corporal².

La medición de los niveles de creatinina en sangre proporcionan la misma información para el diagnóstico y pronóstico de la función renal, que la obtenida por la medición del nitrógeno ureico porque la urea y la creatinina se acumulan en organismos que presentan falla renal. La concentración de estas sustancias en la sangre, plasma o suero es un indicador útil de la magnitud del grado de retención de productos de “*desecho*” del nitrógeno orgánico y, por tanto, del grado de compromiso renal ^{1,2}.

- **Colesterol.**

El colesterol ha recibido gran atención en medicina humana porque se halla implicado en la aterosclerosis, pero su importancia en las enfermedades de los animales domésticos no ha sido aún demostrada. El colesterol se encuentra en todas las fracciones lipídicas de la sangre ².

La mayoría de los animales pueden tener niveles elevados de colesterol (hipercolesterolemia), disfunción hepática y obstrucción del conducto biliar, entre otras afectaciones, después de una alimentación rica en grasa porque la destrucción de las células hepáticas trae como consecuencia una disminución en la actividad metabólica del hígado y se reduce más la degradación del colesterol (catabolismo) que la síntesis del mismo (anabolismo), por lo que los niveles de esta macromolécula en sangre aumentan.

Los niveles bajos de colesterol pueden indicar debilidad muscular o mala absorción de grasa pero son de muy rara incidencia. ²

- **Glucosa.**

La glucosa se metaboliza a través de una ruta metabólica llamada glucólisis. Esta ruta, transforma la glucosa en piruvato y prepara así el metabolismo oxidativo que tendrá lugar en la mitocondria (principalmente). ⁶ Para nuestra supervivencia es esencial mantener una concentración normal de glucosa sanguínea (glucemia) y

ello está vinculado al metabolismo del *glucógeno* que es la forma de almacenamiento a corto y mediano plazo de la glucosa ⁶.

La concentración de glucemia aumenta debido a los glucocorticoides que inhiben la utilización de la glucosa y estimulan la gluconeogénesis. También se elevan los valores de glucosa por diabetes mellitus asociada con hiperadrenocorticalismo, debido a una hipersecreción de las hormonas adrenocorticales por neoplasia o superdosificación de corticoesteroides, se asocia también con hipertiroidismo y convulsiones ².

La concentración de glucosa disminuye por el ayuno o por el ejercicio prolongado, por el exceso de insulina ya sea por un insulinoma o por dosis altas de insulina como terapia; en toxemia, inanición y lesiones hepáticas; también disminuye en hipoadrenocorticalismo debido a una reducción en la secreción de las glándulas adrenales o a una producción reducida de ACTH por la glándula pituitaria ².

- **Triglicéridos.**

Los hidratos de carbono y los lípidos se utilizan principalmente como fuente de energía. Sus formas de almacenamiento en el organismo son el glucógeno y el tejido adiposo, respectivamente ⁶.

Un nivel alto de triglicéridos puede generar pancreatitis y llevar a cuadros aterogénicos y de arterioesclerosis, lo cual incrementa el riesgo de infarto agudo a miocardio y accidentes cerebrovasculares ⁵.

- **Proteína total.**

Los principales componentes estructurales a nivel celular de un organismo, son las proteínas, los carbohidratos y los lípidos.

Las proteínas son los bloques de construcción y los catalizadores biológicos por excelencia. Como unidades estructurales, forman el armazón arquitectónico de los tejidos; como enzimas, junto a moléculas facilitadoras como *coenzimas* y cofactores, catalizan y controlan las reacciones bioquímicas ⁶.

Las proteínas son los principales biopolímeros estructurales y funcionales de los seres vivos. Cumplen con un amplio abanico de funciones, incluida la catálisis de reacciones metabólicas y el transporte de vitaminas, minerales, oxígeno, combustibles y demás sustancias necesarias a nivel celular ⁶.

Las proteínas son sintetizadas como una secuencia de aminoácidos unidos en una estructura poliamida (polipéptidos) lineal, pero adoptan estructuras tridimensionales complejas al realizar sus funciones.⁶

La fuente de proteína unicelular normalmente es la sangre, tejidos o células microbianas tales como bacterias o levaduras⁶.

Las proteínas totales se miden por espectrofotometría o por el método de Biuret; el cual utiliza un reactivo compuesto por iones de cobre a pH alcalino. Se forma un complejo de color violeta cuando el suero o el plasma se mezclan con el reactivo. La intensidad del color violeta es proporcional al número de enlaces peptídicos presentes y por lo tanto, proporcional a la cantidad de proteínas totales presentes¹.

El incremento en las proteínas totales, puede deberse a una respuesta por daño o estrés celular; como es el caso de una deshidratación por vómito o diarrea, la cual se caracteriza por una hipertonia en la concentración del soluto extracelular ocasionando que la célula se drene. El incremento en las proteínas totales se asocia también con un aumento en el nivel de globulina cuando no existe deshidratación, como se evidencia en algunas enfermedades hepáticas avanzadas (cirrosis), infecciones crónicas y en algunos casos de neoplasias.

Una disminución en los niveles de las proteínas totales se debe siempre a un nivel bajo de la albúmina sérica, acompañado ya sin incremento del nivel de globulina, o por un incremento en el nivel de globulina que es menor que el descenso en el nivel de albúmina sérica².

- **Urea/BUN.**

La urea es un compuesto orgánico relativamente simple producido por los mamíferos en el hígado, como producto final del catabolismo de las proteínas. Es una de las sustancias más difusibles en el organismo y se encuentra en todos los líquidos corporales. Es relativamente atóxica, aunque en concentraciones altas desnaturaliza proteínas, convirtiéndolas en productos tóxicos².

La urea es el principal producto metabólico de desecho de los mamíferos y, en última instancia, se excreta casi de forma exclusiva por la orina. La urea es una molécula pequeña, sin carga (masa molecular relativa a 60 Daltons) que no se une a las proteínas¹.

Muchos autores se refieren a la concentración de urea en sangre en términos de *cantidad de nitrógeno ureico*, más que de *molécula entera de urea* (de aquí el término de *nitrógeno ureico sanguíneo*, *BUN*, por sus siglas en inglés) ¹. El BUN se obtiene dividiendo el valor de la urea entre 2.14 ⁷.

La urea se aumenta en sangre por trastornos renales como la insuficiencia renal crónica y aguda; por obstrucción de las vías urinarias; excesiva destrucción de proteínas como en estados de fiebre, toxicidad o sépsis severa. También se pueden aumentar los niveles de urea por una hemoconcentración debida generalmente a graves vómitos o diarreas; cuando existe alteración de la función cardiaca que reduce el flujo de sangre a través del riñón se ve aumentada la concentración de urea en sangre. El descenso en los niveles de urea son raros, teóricamente pueden presentarse en asociación con graves enfermedades hepáticas o malnutrición de proteínas. ²

5.1.2 VALORES DE REFERENCIA.

El *rango de referencia* se define como el rango de valores en su totalidad (valores medidos reales del máximo al mínimo) obtenidos para un test en una población de animales sanos, no enfermos. ¹

	UNIDADES	EQUINO	CANINO	FELINO
ALT/GPT	U/L	30 – 110	28 – 78	10 - 80
AST/GOT	U/L	175 – 340	14 – 45	12 - 43
CK	U/L	120 – 470	20 – 200	50 - 450
CREATININA	mg/dL	0.6 - 2.2	0.3 - 1.4	0.3 - 2.1
COLESTEROL	mg/dL	200 – 500	70 – 250	73 - 300
GLUCOSA	mg/dL	65 – 110	60 – 110	70 - 150
TRIGLICERIDOS	mg/dL	180 – 320	16 – 120	21 - 155
PROTEÍNA TOTAL	g/L	110 – 310	55 – 78	55 - 79
UREA/BUN	mg/dL	15 - 53 7 - 25	15 – 53 7 – 25	21 - 64 10 - 30

Tabla 1. VALORES DE REFERENCIA DE PERFIL BIOQUIMICO PARA EQUINOS, CANINOS Y FELINOS.

5.2 LABORATORIO CLÍNICO VETERINARIO.

El laboratorio clínico es el lugar donde los profesionales de laboratorio de diagnóstico clínico (Tecnólogo Médico, Técnicos Superiores de Laboratorio Clínico, Bioquímicos, Químicos Fármaco Biólogos –QFB- y Médicos) realizan análisis clínicos que contribuyen al estudio, prevención, diagnóstico y tratamiento de los problemas de salud de los pacientes. También se les conoce como Laboratorio de Patología Clínica.

Estos laboratorios de análisis clínicos, de acuerdo con sus funciones, se pueden dividir en:

1. Laboratorios de rutina: Estos laboratorios tienen cuatro departamentos básicos: Hematología, Inmunología, Microbiología y Química Clínica (o Bioquímica).

2. Laboratorios de especialidad: En estos laboratorios se realizan estudios más sofisticados, utilizando metodologías como amplificación de ácidos nucleicos, estudios cromosómicos, citometría de flujo y cromatografía de alta resolución, entre otros.⁵

5.2.1 LEGISLACIÓN COLOMBIANA PARA LABORATORIOS CLÍNICOS VETERINARIOS.

Se tendrán en cuenta para establecimientos que ofrezcan servicios médicos veterinarios y afines, todas las exigencias sanitarias contempladas en la Ley 09 de 1979, en cuanto a instalaciones físicas y sanitarias, condiciones de saneamiento, salud ocupacional y protección contra accidentes, emisiones atmosféricas, ruidos y olores, bioseguridad y demás normatividad específica, lo cual se verificará mediante el acta concertada de inspección.³

El marco normativo colombiano que aplica y tiene vigencia para los laboratorios clínicos veterinarios, se encuentra consignada en la **TABLA 2**. Este marco, aplica para establecimientos veterinarios y afines y se normalizan las actividades de inspección, vigilancia y control de los mismos.

NORMA	ENTIDAD	GENERALIDAD
Constitución Política de Colombia.	Asamblea Nacional Constituyente.	Son fines esenciales del Estado: servir a la comunidad, promover la prosperidad general y garantizar la efectividad de los principios, derechos y deberes consagrados en la Constitución.
Ley 09.	Congreso de la República de Colombia.	Por el cual se dictan medidas sanitarias.
Ley 73 de 1985.	Congreso de la República de Colombia.	Por la cual se dictan normas para el ejercicio de las profesiones de medicina veterinaria, medicina veterinaria y zootecnia y zootecnia.
Ley 84 de 1989.	Congreso de la República de Colombia.	Estatuto Nacional de Protección de los Animales.
Ley 430 de 1998.	Congreso de la República de Colombia.	Por el cual se dictan normas prohibitivas en materia ambiental, referentes a los desechos peligrosos y se dictan otras disposiciones.
Ley 576 de 2000.	Congreso de la República de Colombia.	Por la cual se expide el Código de Ética para el ejercicio profesional de la medicina veterinaria, la medicina veterinaria y zootecnia y zootecnia. Sobre los profesionales autorizados para prescribir medicamentos sometidos a fiscalización.
Ley 1122 de 2007.	Congreso de la República de Colombia.	Por la cual se hacen algunas modificaciones en el Sistema General de Seguridad Social en Salud y se dictan otras disposiciones, artículos 35, 36, 37.
Ley 1252 de 2008.	Congreso de la República de Colombia.	Por la cual se dictan normas prohibitivas en materia ambiental, referentes a los residuos y desechos peligrosos y se dictan otras disposiciones.
Decreto 2257 de 1986.	Ministerio de Salud y Protección Social.	Por el cual se reglamentan parcialmente los títulos VII y XI de la ley 9ª de 1979, en cuanto a investigación, prevención y control de las zoonosis.
Decreto 1122 de 1988.	Ministerio de Educación Nacional.	Por el cual se reglamenta la ley 073 de 1985, sobre el ejercicio de las profesiones de medicina veterinaria y zootecnia, de medicina veterinaria y de zootecnia.
Resolución 2400 de 1979.	Ministerio de Trabajo y Seguridad Social.	Por la cual se establecen algunas disposiciones sobre vivienda, higiene y seguridad en los establecimientos de trabajo.

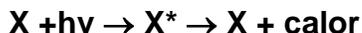
Tabla 2. MARCO NORMATIVO COLOMBIANO PARA ACTIVIDADES DE INSPECCIÓN, VIGILANCIA Y CONTROL DE ESTABLECIMIENTOS VETERINARIOS Y AFINES.

5.3 TÉCNICAS PARA LA MEDICIÓN EN QUÍMICA SANGUÍNEA: FOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA-VISIBLE (FOTOCOLORIMETRÍA)

La absorción de radiación en la zona ultravioleta y visible del espectro se ha utilizado ampliamente desde hace muchos años para el análisis cuantitativo. Las medidas se basan en la ley de Lambert-Beer que es una de las ecuaciones que más se usan en Química Analítica, ya que relaciona la absorción de la radiación con la concentración de un compuesto en disolución. ⁸

La espectrofotometría de absorción en las regiones ultravioleta y visible del espectro electromagnético es, posiblemente, la más utilizada en la práctica del análisis cuantitativo de todas las técnicas espectroscópicas. Asimismo, puede resultar de utilidad como técnica auxiliar para la determinación de estructuras de especies químicas. ⁹

Se basa en la absorción de la radiación ultravioleta y visible por el analito, como consecuencia de lo cual se origina un estado activado que posteriormente elimina su exceso de energía en forma de calor, en un proceso que esquemáticamente puede representarse así:



En donde:

X= Especie en estado fundamental.

hν= Energía de la radiación incidente.

X*= Especie en estado excitado.

El término generalmente empleado en la medida de la radiación absorbida es el de **absorciometría**, si bien, normalmente se utiliza la denominación de **colorimetría** cuando se trabaja en la región visible del espectro electromagnético. ⁹

Por otra parte, el término **espectrofotometría** suele aplicarse cuando la radiación utilizada se extiende a las regiones ultravioleta e infrarroja. ⁹

5.3.1 ALGUNOS CONCEPTOS FUNDAMENTALES.

Radiación Electromagnética (R.E.M): Forma de energía que se transmite por el espacio a gran velocidad sin soporte de la materia. Las propiedades de la R.E.M

se pueden explicar siguiendo las teorías clásico-ondulatorias y mecánico-cuánticas. Desde el punto de vista del modelo ondulatorio, las ondas electromagnéticas pueden ser descritas como una combinación de campos eléctricos y magnéticos oscilantes, perpendiculares entre sí, y perpendiculares a la dirección de propagación de la onda.⁸

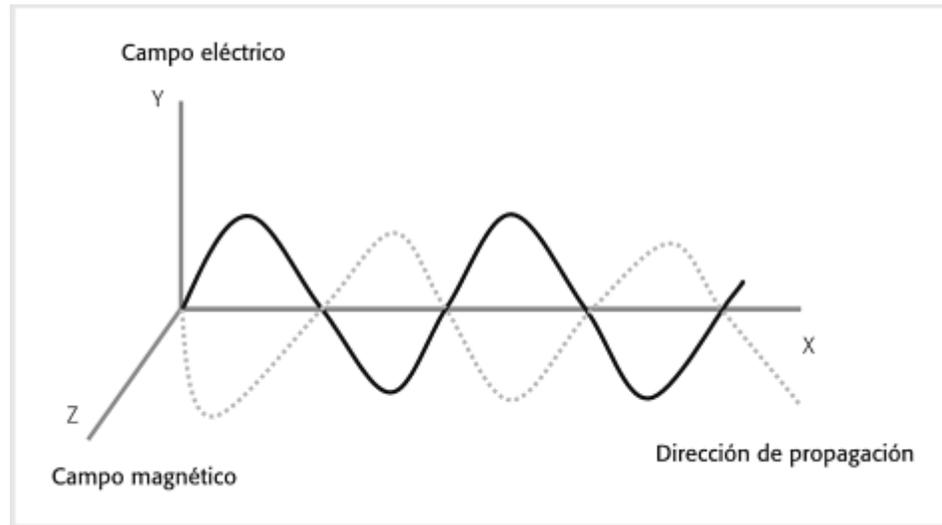


Ilustración 1. RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA (R.E.M) POLARIZADA EN EL PLANO QUE SE PROPAGA.

Longitud de onda (λ): Es la distancia lineal entre dos puntos equivalentes de ondas sucesivas (distancia entre dos crestas y dos valles).⁸

Espectro Electromagnético: Es el amplio intervalo de radiaciones electromagnéticas (R.E.M) que se extiende desde los rayos gama (γ) (radiación más energética), hasta las ondas de radio (radiación menos energética). Aunque no hay fronteras bruscas entre zonas espectrales adyacentes, el espectro electromagnético se divide en varias regiones en función, principalmente, de los métodos que se precisan para generar y detectar diversas clases de radiación.⁸

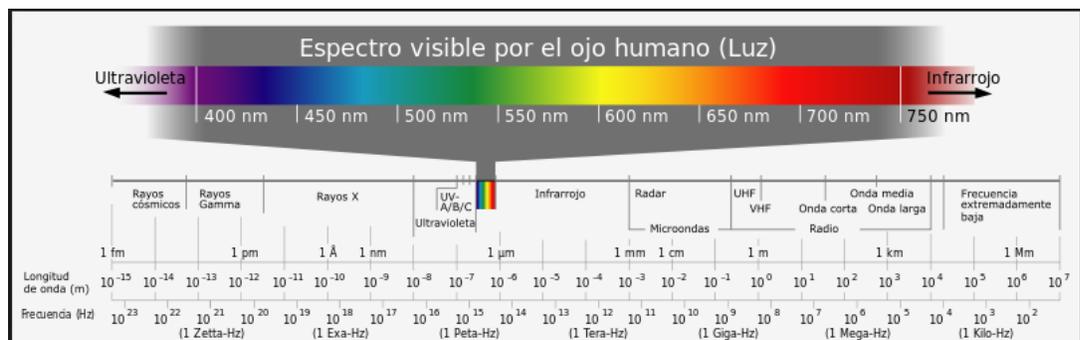


Ilustración 2. ESPECTRO ELECTROMAGNÉTICO.

5.3.2 LEY DE LAMBERT-BEER.

Si consideramos un haz de radiación monocromática de intensidad I_0 que pasa a través de un recipiente de espesor b que contiene una especie absorbente de concentración C , se producirá una disminución de la intensidad del haz (I) debido a la interacción entre los fotones y la especie absorbente.⁸

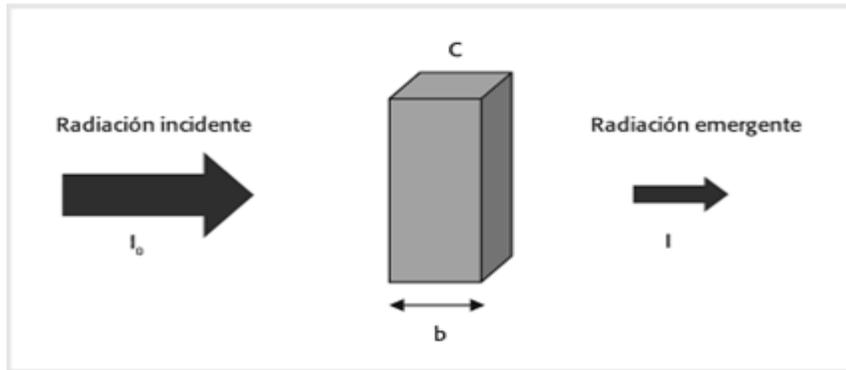


Ilustración 3. ATENUACION DE LA R.E.M AL PASAR POR UN MEDIO ABSORBENTE.

La atenuación de la radiación a medida que ésta pasa a través de un medio absorbente se puede describir cuantitativamente mediante dos términos distintos, pero relacionados entre sí, la transmitancia y la absorbancia. A la fracción de radiación incidente que pasa a través de la muestra se le denomina **transmitancia** (T) y toma valores entre 0 y 1. La T se puede expresar en % de acuerdo a la ecuación:

$$\%T = (I/I_0) \cdot 100$$

La inversa del logaritmo decimal de la transmitancia es la **absorbancia** (A) y se calcula con la ecuación:

$$A = -\log_{10} T = \log(I_0/I)$$

La **ley de Lambert-Beer**, es una ecuación fundamental en los métodos espectrométricos de análisis, ya que permite calcular la concentración de una sustancia a partir de la radiación absorbida por una disolución de la misma, así:

$$A = a \cdot b \cdot C$$

Donde a es la **absortividad**, b es la trayectoria del haz incidente (camino o paso óptico, generalmente 1cm) y C la concentración de la disolución. La absortividad es la constante que relaciona la absorbancia con la concentración de la especie absorbente y sus unidades dependerán de las unidades empleadas para la

concentración. Así, si C se expresa en g/L, la absorptividad tendrá unidades de L/g*cm. Sin embargo, cuando C se expresa en mol/L, la absorptividad se denomina **absorptividad molar**, representada por el símbolo ϵ , y tendrá unidades de L/mol*cm. ⁸

Cuando se **cumple la ley de Beer**, es aplicable la siguiente relación: “*sean dos soluciones de la misma sustancia absorbente, una de concentración **conocida** y otra de concentración **desconocida**, ambas absorben el mismo color complementario o la misma λ* ”. Relacionándolas tenemos:

$$A_1 = \epsilon_1 b_1 C_1 \text{ (1)} \quad A_2 = \epsilon_2 b_2 C_2 \text{ (2)}: \quad \text{Ambas sustancias son de un sistema que cumple la ley de Beer.}$$

C_1 = Concentración conocida.

C_2 = Concentración desconocida.

$\epsilon_1 = \epsilon_2$ Absorptividad molar.

$b_1 = b_2$ Longitud del paso óptico que contiene la muestra (celda)

$C_1 \neq C_2$

Dividiendo **(1)** entre **(2)**, tenemos:

$(A_1 = \epsilon_1 b_1 C_1) / (A_2 = \epsilon_2 b_2 C_2)$, simplificando queda:

$$A_1 / A_2 = C_1 / C_2$$

Luego $A_1 / C_1 = A_2 / C_2$

Si $A_1 = A_p$ = Absorbancia del patrón.

$C_1 = C_p$ = Concentración del patrón.

$A_2 = A_m$ = Absorbancia de la muestra.

$C_2 = C_m$ = Concentración de la muestra (concentración desconocida).

La relación quedará:

$$A_p / C_p = A_m / C_m$$

Entonces:

$$C_m = C_p (A_m / A_p).$$

Este método de cálculo de concentraciones a partir de medidas de absorbancia es muy utilizado es espectroscopia.¹⁰

5.3.3 INSTRUMENTACIÓN.

Los instrumentos para medir la absorción selectiva de radiaciones se suelen denominar **fotómetros**, que permiten determinar la intensidad luminosa con mayor exactitud que el ojo humano como detector.¹⁰

Los fotómetros se encuentran desde los más sencillos o manuales, hasta los automatizados y con cierta “inteligencia”, encontrándose también los semiautomáticos, automáticos y de diseños especiales.¹⁰

Un fotómetro sencillo contiene los siguientes componentes:

- **El sistema para generar la señal analítica, conformado por:**
 1. Una **fuentes de radiaciones** (lámpara) que genera la señal emitiendo un espectro continuo o de líneas según el instrumento.
 2. Un **sistema selector** que permite seleccionar la longitud de onda que puede ser absorbida por la sustancia.
 3. Un **recipiente o celda**, para colocar la sustancia a analizar.
- Un dispositivo de medición de **luz específica** para valorar la intensidad de la radiación, en lugar del ojo humano, el cual no es muy preciso y está constituido por:
 4. **El detector.**
 5. **El amplificador.**
 6. **El instrumento de lectura.**

Se ha tomado como referencia de estudio la región del espectro visible, pero la metodología es aplicable a cualquier región del espectro (UV,IR), siempre que la fuente de radiaciones, el sistema selector, el recipiente para la muestra y el sistema de medición sean los adecuados para cada región.¹⁰

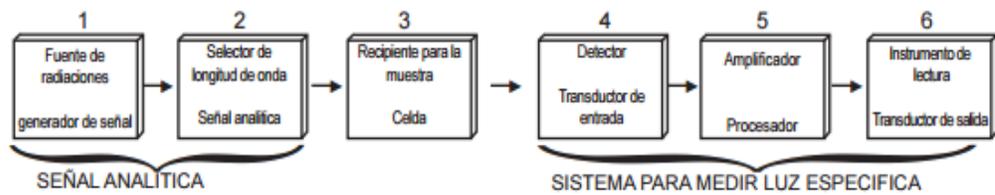


Ilustración 4. DIAGRAMA DE BLOQUES QUE ILUSTRAN LAS PARTES QUE CONFORMAN UN ESPECTROFOTOMETRO SENCILLO.

5.4 PARÁMETROS DE CALIDAD ANALÍTICA.

Desde el punto de vista práctico, la aplicación de una técnica analítica comprende los procedimientos realizados con la toma y el tratamiento de la muestra para adecuarla a la forma de introducción en el equipo, preparación de estándares o patrones de referencia, blanco para el ajuste de la señal, tratamiento estadístico de los datos para obtener los resultados y la confiabilidad de los mismos para su reporte; lo cual exige estudios adicionales.¹⁰

Los atributos de calidad pueden ser de tipo estadístico o de tipo operativo/económico. Entre los primeros, figuran los parámetros fundamentales de exactitud (relacionados con la trazabilidad), precisión (relacionado con la incertidumbre) y también pueden ser de selectividad, sensibilidad, límites de detección, cuantificación y robustez. Entre los criterios de tipo operativo/económico se encuentran, la facilidad de comprensión del método y manejo de la instrumentación, la rapidez del análisis, su costo, la inversión, el mantenimiento, etc.¹¹

En la **tabla 3** se enumeran los criterios cuantitativos de funcionamiento de los instrumentos, criterios que se pueden utilizar para decidir si un determinado método instrumental es o no adecuado para resolver un problema analítico. Estas características se expresan en términos numéricos y se denominan **parámetros de calidad**.

10

CRITERIO	PRECISIÓN	SESGO	SENSIBILIDAD	LÍMITE DE DETECCIÓN
Parámetro de calidad.	Desviación estándar absoluta, desviación estándar relativa, coeficiente de variación, varianza.	Error absoluto sistemático, error relativo sistemático.	Sensibilidad de calibración, sensibilidad analítica.	Blanco más tres veces la desviación estándar del blanco.

Tabla 3. CRITERIOS ANALITICOS PARA SELECCIONAR MÉTODOS ANALÍTICOS.

5.4.1 PRECISIÓN.

La precisión de los datos analíticos se define como el grado de concordancia mutua entre los datos que se han obtenido de una misma forma. La precisión indica la medida del error aleatorio o indeterminado de un análisis. Los parámetros de calidad de la precisión son los presentados en la **tabla 4**.¹⁰

DESVIACION ESTANDAR ABSOLUTA (s)	DESVIACIÓN ESTANDAR RELATIVA (DER)	COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV)	VARIANZA (s ²)
$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$	$RSD = \frac{s}{\bar{x}}$	$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\%$	s^2

Tabla 4. PARÁMETROS DE CALIDAD DE LA PRECISIÓN.

Cabe decir que la Unión Internacional para la Química Pura y Aplicada (*IUPAC*) establece la **repetibilidad** como la precisión de un método en función de análisis independientes realizados por un mismo analista, en el mismo laboratorio, con la misma técnica y el mismo instrumento en un intervalo corto de tiempo (precisión dentro de rachas), mientras que la **reproducibilidad** se refiere a la precisión de un método con datos obtenidos a partir de determinaciones independientes efectuadas en condiciones diferentes, en distintos laboratorios y con distintos equipos u operadores (precisión fuera de rachas).¹²

5.4.2 SESGO.

El sesgo mide el error sistemático o determinado de un método analítico y se define mediante la ecuación:

$$\text{Sesgo} = \mu - x_t$$

Donde μ es la media de la población de la concentración de un analito en una muestra cuya concentración verdadera es x_t .¹⁰

5.4.3 SENSIBILIDAD.

La sensibilidad de un instrumento o de un método es una medida de su capacidad de diferenciar pequeñas variaciones en la concentración del analito. Dos factores limitan la sensibilidad: la pendiente de la curva de calibrado y la reproducibilidad o precisión del sistema de medida.¹⁰

La definición cuantitativa de sensibilidad aceptada por la I.U.P.A.C, es la **sensibilidad de calibrado**, que se define como la pendiente de la curva de calibrado a la concentración objeto de estudio. La mayoría de las curvas de calibrado que se usan en química analítica son lineales y se pueden representar mediante la ecuación:

$$S = mc + S_{bi}$$

En la que **S** es la señal medida, **c** es la concentración del analito, **S_{bi}** es la señal instrumental del blanco y **m** es la pendiente de la línea recta. El valor **S_{bi}** será la intersección de la recta con el eje Y en dichas curvas, la sensibilidad de calibrado es independiente de la concentración **c** y es igual a **m**.¹⁰

5.4.4 LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.

El límite de detección es la mínima cantidad de especie a identificar que genera una señal analítica *significativamente diferente* de la señal del blanco o ruido de fondo.¹²

Esta descripción proporciona al analista un buen margen de libertad para decidir la definición exacta del límite de detección basada en una adecuada interpretación de la frase "*significativamente diferente*". Aún no existe un acuerdo total entre investigadores, editores y asociaciones profesionales y estatutarias sobre este punto. Sin embargo, va en aumento la tendencia a definir el **límite de detección** como la concentración del analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco, **y_B**, más tres veces la desviación estándar del blanco, **s_B**.¹³

$$\text{Límite de detección (LD)} = y_B + 3 s_B$$

El **límite de cuantificación** de un método es la mínima cantidad de analito que se puede cuantificar con suficiente precisión y exactitud. Se define como la cantidad de analito que proporciona una señal igual a la del blanco más diez veces la desviación estándar del blanco.

$$\text{Límite de cuantificación (LQ)} = y_B + 10s_B$$

6 MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 DISEÑO METODOLÓGICO

La metodología consiste en seis (6) etapas con las que se pretenden desarrollar los objetivos específicos planteados para el trabajo.

ETAPA	ACTIVIDAD
Documentación	Estudio del fundamento químico de los métodos. Leer y apropiarse el material bibliográfico necesario.
Manejo del equipo	Instrucción por parte del proveedor sobre el manejo del equipo y el cuidado de sus partes.
Elección de las condiciones experimentales adecuadas	Adaptación de los métodos a las condiciones del laboratorio. Eligiendo las condiciones apropiadas para el correcto funcionamiento de los métodos de análisis.
Determinación de los parámetros de calidad analítica	Análisis numérico de las características que avalan la calidad analítica de las mediciones; estas características son: precisión (reproducibilidad), sesgo, sensibilidad, límites de detección y cuantificación.
Creación del manual de operación	Digitación del Manual de Química Sanguínea, donde se consignaran los resultados obtenidos de la implementación de la metodología y se darán las recomendaciones necesarias para el correcto desempeño de los métodos.

Tabla 5. DISEÑO METODOLÓGICO.

6.2 MUESTRAS DE SUERO SANGUÍNEO.

Las muestras de suero sanguíneo fueron principalmente de tres (3) clases: Suero Calibrador, Suero Control de Bioquímica (proporcionados por BioSystems) y Suero de muestras provenientes de bovinos, equinos, caninos y felinos.

6.2.1 SUERO CALIBRADOR DE BIOQUÍMICA.

El suero Calibrador de Bioquímica fue proporcionado por el *Centro Integral de Diagnóstico Agropecuario del Risaralda – CIDAR* -; es un suero bovino liofilizado que contiene diversos componentes a concentraciones adecuadas para la calibración de los procedimientos de medida. Los componentes estructurales de este Suero Calibrador se presentan en la **tabla 5**:

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN	
	VALOR	UNIDAD
Ácido úrico	7.9	mg/dL
Albúmina	30	g/L
ALT/GPT	105	U/L
α-Amilasa	288	U/L
AST/GOT	120	U/L
Bilirrubina directa	1.01	mg/dL
Bilirrubina total	3.9	mg/dL
Calcio	11.7	mg/dL
CK	326	U/L
Cloro	105	mmol/L
Colesterol	203	mg/dL
Creatinina	3.11	mg/dL
Fosfatasa ácida	27.1	U/L
Fosfatasa alcalina	313	U/L
Fósforo	6.56	mg/dL
Glucosa	181	mg/DI
γ-GT	141	U/L
Hierro	136	µg/dL
LDH	245	U/L
Lipasa	112	U/L
Magnesio	1.95	mg/dL
Potasio	4.99	mmol/L
Proteína total	56	g/L
Sodio	138	mmol/L
Triglicéridos	123	mg/dL
Urea	83	mg/dL

Tabla 6. VALORES DE REFERENCIA DE LOS COMPONENTES EN EL SUERO CALIBRADOR DE BIOQUÍMICA, TOMADOS DEL INSERTO QUE PROPORCIONA EL PROVEEDOR.

6.2.2 SUERO CONTROL DE BIOQUÍMICA.

El suero Control de Bioquímica fue proporcionado por el *Centro Integral de Diagnóstico Agropecuario del Risaralda –CIDAR-* es un suero bovino liofilizado que contiene diversos componentes a concentraciones adecuadas para el control de calidad. Este tipo de Suero actúa como un control de calidad interno mediante el cual se verifica la funcionalidad del procedimiento de medida. Contiene los mismos componentes del Suero Calibrador, que se encuentran consignados en el numeral **5.1.1** pero en las siguientes concentraciones:

COMPONENTE	CONCENTRACION	
	VALOR	UNIDAD
Ácido úrico	5.79	mg/Dl
Albúmina	26.1	g/L
ALT/GPT	32.5	U/L
α-Amilasa	78.8	U/L
AST/GOT	45.2	U/L
Bilirrubina directa	0.625	mg/dL
Bilirrubina total	2.03	mg/dL
Calcio	9.39	mg/dL
CK	188	U/L
Cloro	85	mmol/L
Colesterol	156	mg/dL
Creatinina	1.57	mg/dL
Fosfatasa ácida	8.32	U/L
Fosfatasa alcalina	165	U/L
Fósforo	3.92	mg/dL
Glucosa	85.6	mg/dL
γ-GT	41.1	U/L
Hierro	110	µg/dL
LDH	180	U/L
Lipasa	66.2	U/L
Magnesio	1.14	mg/dL
Potasio	4.07	mmol/L
Proteína total	50.9	g/L
Sodio	113	mmol/L
Triglicéridos	52.3	mg/dL
Urea	28.6	mg/dL

Tabla 7. VALORES DE REFERENCIA DE LOS COMPONENTES EN EL SUERO CONTROL DE BIOQUÍMICA, TOMADOS DEL INSERTO QUE PROPORCIONAR EL PROVEEDOR.

6.2.3 MUESTRAS DE SUERO SANGUÍNEO.

Las muestras de suero sanguíneo fueron proporcionadas por la Clínica Veterinaria EJEVET; tales muestras correspondían a caninos y felinos. También algunas muestras fueron proporcionadas por el CIDAR y correspondían a bovinos y equinos.

6.3 EQUIPO.



Ilustración 5. EQUIPO EMPLEADO: BTS-350 ANALIZADOR SEMIAUTOMATIZADO.

Especificaciones técnicas:

Fuente de luz con LED.

- Equipo con características únicas en un segmento con el más completo rango de LED's 340, 405, 505, 535, 560, 600, 635, 670 nm y dos posiciones libres adicionales.
- Bajo consumo eléctrico (consumo medio 5 watts).
- Vida media del sistema de iluminación LED: 5 años.

Sistema fotométrico de doble haz.

- Alta estabilidad en la lectura. Debido a la disposición de los LED, la luz es medida simultáneamente antes y después de la muestra lo que permite estabilizar cualquier desviación de la fuente de luz y dar una estabilidad de lectura superior a 0.001 en 60 minutos.
- Resultados mejorados e lectura de parámetros turbidimétricos.

Diseño óptico optimizado.

- Filtros "hard coating" de larga duración.
- Rango de medición de 0 a 3.5 A en todas las longitudes de onda.

- Máximo rendimiento en medidas tanto de absorbancia molecular (bioquímica) como de dispersión (turbidimetría).

Sistema de aspiración fluídica de alta precisión.

- Flujo de cubeta de solo 18µL.
- Bomba peristáltica incorporada.
- Volumen de aspiración programable desde 100µL a 5mL.
- Cubetas macro, semi-micro y micro.

Conjunto fotométrico estático.

- No contiene partes móviles.
- Sin rotor de filtros.

Instrumento de bajo mantenimiento.

- No requiere cambio de lámparas ni filtros.
- Sistema de alimentación energética.

Además de conexión eléctrica, posee un sistema de baterías con indicador de consumo.

- Autonomía en un corte de luz en un período de 2 horas, sin pérdida de medición de reacción en curso.

Sistema termostático.

- Cubeta *Peltier* de 25 a 40°C.

Puerto USB.

- Permite la exportación de gráficos y resultados sobre memoria.
- Capacidad de almacenamiento.
- Hasta 2000 resultados.

Software de fácil manejo.

- Programable en español y otros idiomas.

Control de calidad interno.

- Se muestran las gráficas de Levey-Jenings con 31 resultados.
- El análisis del control interno permite aplicar las reglas de Westgard.

6.4 METODOLOGÍA.

6.4.1 ANALITOS.

Los analitos de interés para la estandarización de los métodos fotométricos, son:

- Alanina Aminotransferasa (ALT/GPT).
- Aspartato Aminotransferasa (AST/GOT).
- Colesterol.
- Creatina Quinasa (CK).
- Urea.
- * Creatinina.
- * Glucosa.
- * Proteína total.
- * Triglicéridos.

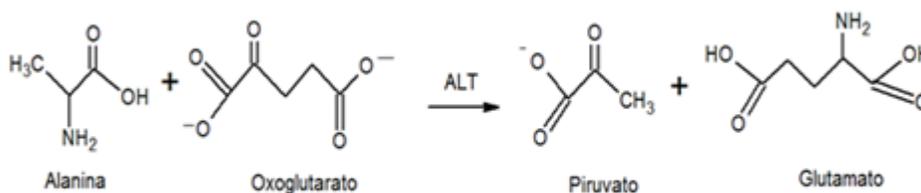
6.4.2 MÉTODOS.

Los métodos mediante los cuales se medirán los analitos para realizar la estandarización son:

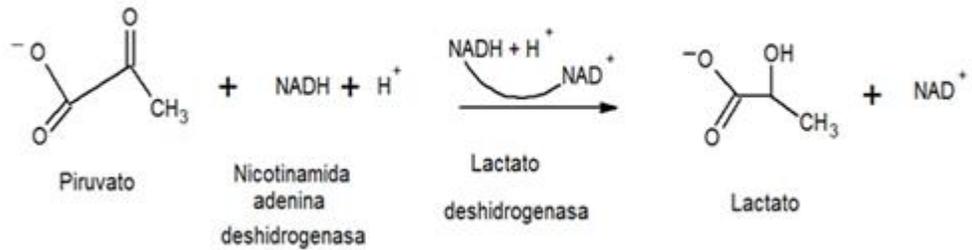
6.4.2.1 MÉTODO IFCC (FEDERACIÓN INTERNACIONAL DE QUÍMICA CLÍNICA Y LABORATORIO CLÍNICO) PARA LA DETERMINACIÓN DE ALT-GPT.

FUNDAMENTO DEL MÉTODO.

La alanina aminotransferasa (ALT o GPT) cataliza la transferencia del grupo amino de la alanina al oxoglutarato, formando piruvato y glutamato. La concentración catalítica se determina, empleando la reacción acoplada de la Lactato Deshidrogenasa (LHD), a partir de la velocidad de desaparición del $\text{NADH} + \text{H}^+$ (nicotinamida adenina deshidrogenasa), medido a una longitud de onda (λ) de 340nm.



- a. Transferencia del grupo amino de la alanina al oxoglutarato, formando piruvato y glutamato.



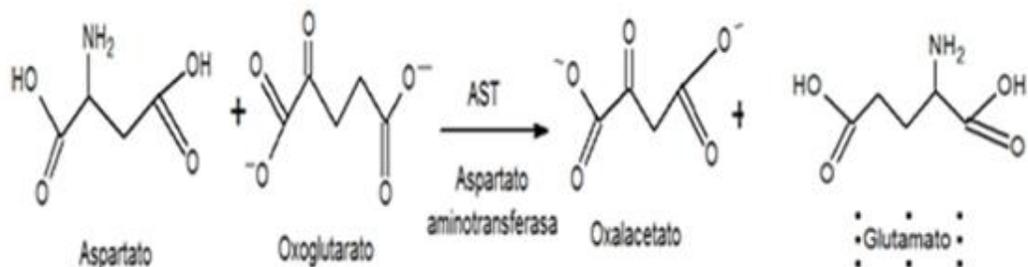
b. Oxidación del NADH+H⁺ hasta NAD⁺ con la reducción del piruvato a lactato.

Ilustración 6. REACCIONES ASOCIADAS AL MÉTODO IFCC PARA DETERMINACIÓN DE AL/GPT. TOMADO DE INSTRUCTIVO PROPORCIONADO POR EL PROVEEDOR.

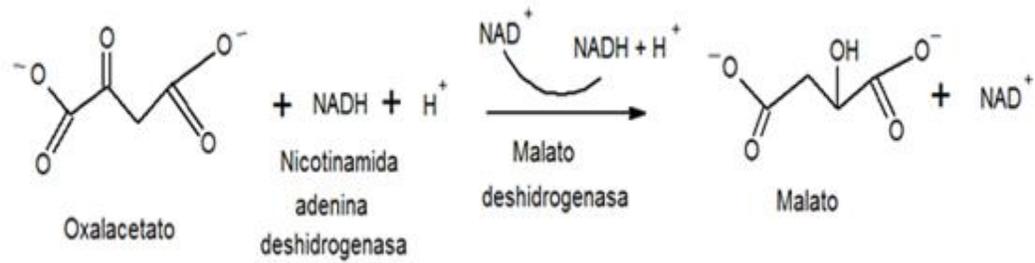
6.4.2.2 MÉTODO IFCC (FEDERACIÓN INTERNACIONAL DE QUÍMICA CLÍNICA Y LABORATORIO CLÍNICO) PARA LA DETERMINACIÓN DE AST-GOT.

FUNDAMENTO DEL MÉTODO.

La aspartato aminotransferasa (AST o GOT) cataliza la transferencia del grupo amino del aspartato al oxoglutarato, formando oxalacetato y glutamato. La concentración catalítica se determina, empleando la reacción acoplada de la Malato Deshidrogenasa (MDH), a partir de la velocidad de desaparición del NADH+H⁺ (nicotinamida adenina deshidrogenasa), medida a una longitud de onda (λ) de 340nm.



a. Transferencia del grupo amino del aspartato al oxoglutarato, formando oxalacetato y glutamato.



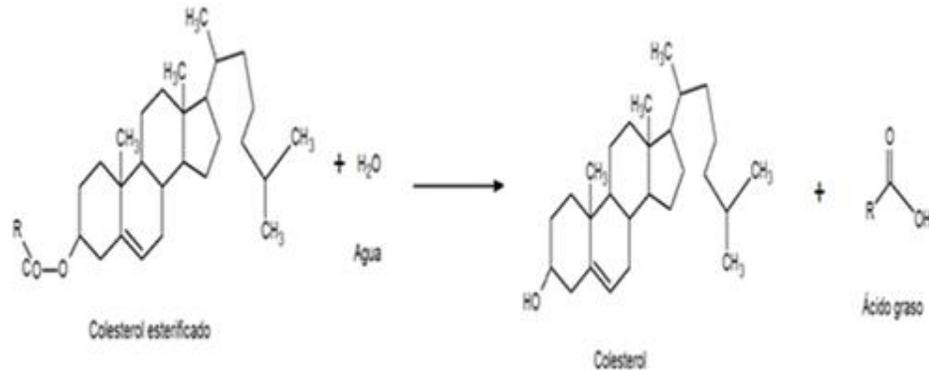
b. Oxidación del NADH hasta NAD⁺ con la reducción del oxalaceto a malato.

Ilustración 7. REACCIONES ASOCIADAS AL MÉTODO IFCC PARA DETERMINACIÓN DE ASTGOT. TOMADO DE INSTRUCTIVO PROPORCIONADO POR EL PROVEEDOR.

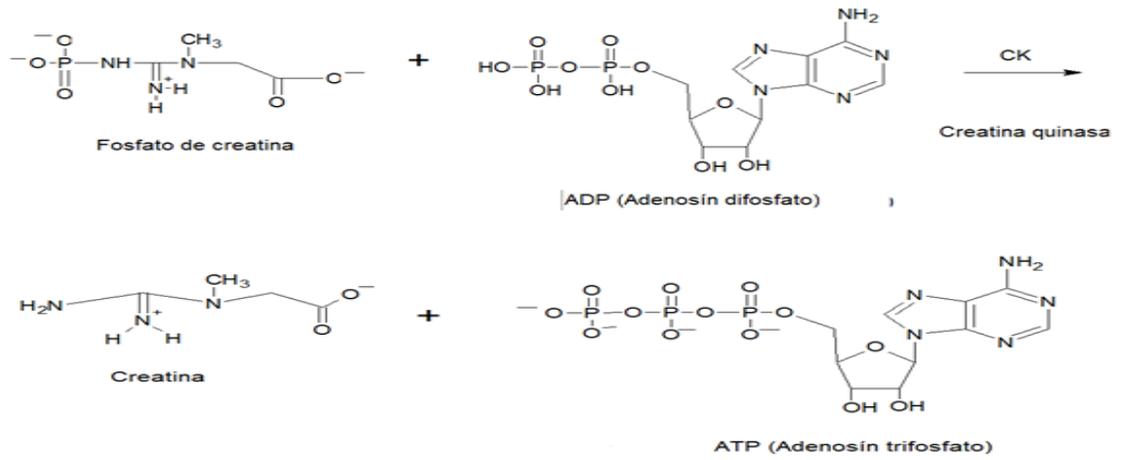
6.4.2.3 MÉTODO IFCC (FEDERACIÓN INTERNACIONAL DE QUÍMICA CLÍNICA Y LABORATORIO CLÍNICO) DE LA OXIDASA-PEROXIDASA PARA LA DETERMINACIÓN DE COLESTEROL.

FUNDAMENTO DEL MÉTODO.

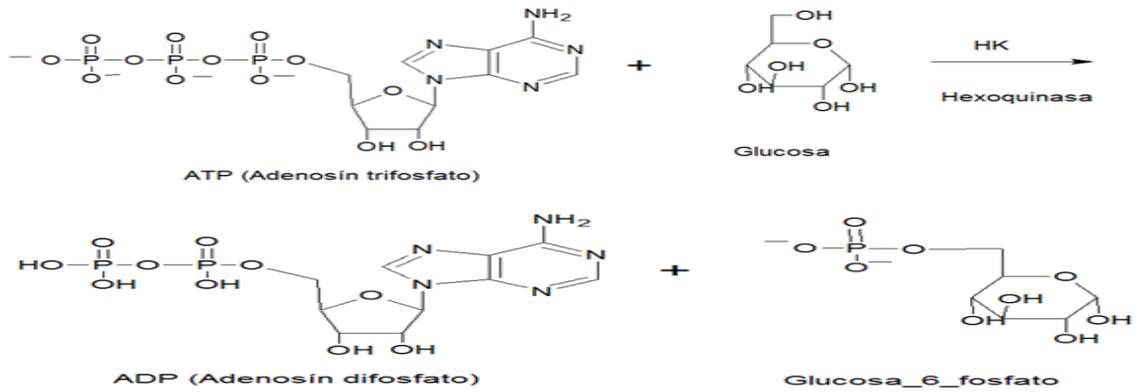
Tanto el colesterol libre como el esterificado presente en la muestra, originan, según las reacciones acopladas descritas a continuación, un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría, medido a una longitud de onda (λ) de $500 \pm 20\text{nm}$.



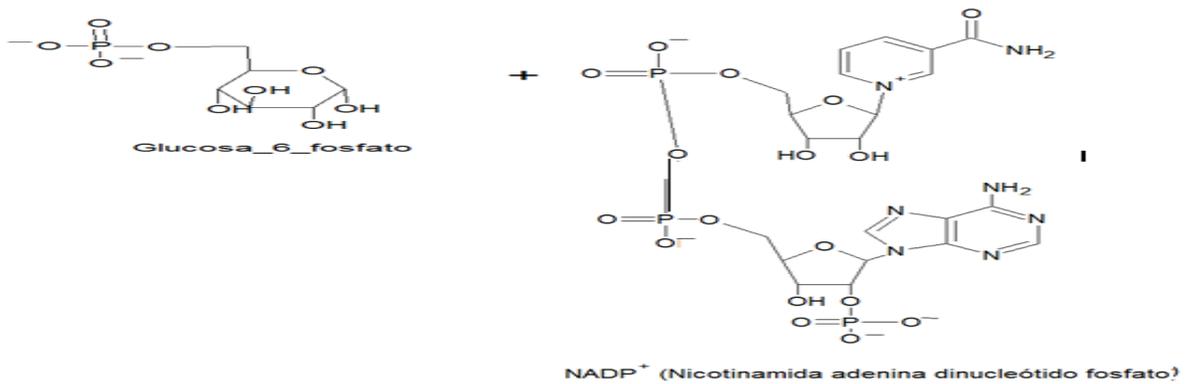
a. Una colesterol esterasa hidroliza los esteres del colesterol a colesterol y ácidos grasos libre.

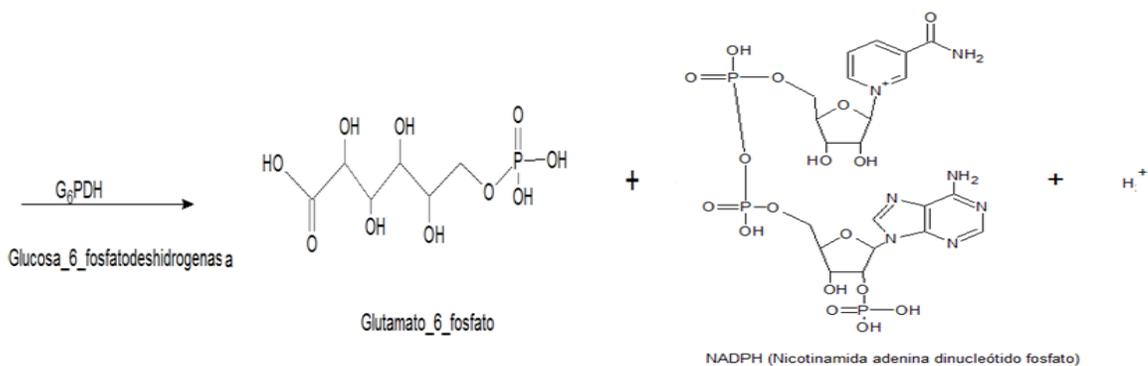


a. Fosforilación del ADP por el fosfato de creatina, obteniéndose creatina y ATP.



b..... La glucosa se fosforila por la hexoquinasa. La hexoquinasa une el fosfato del ATP mediante un enlace fosfoéster y la transforma en Glucosa-6-fosfato.





c. Reducción del NADP⁺ hasta NADPH

Ilustración 9. REACCIONES ASOCIADAS AL MÉTODO IFCC PARA DETERMINACIÓN DE CK. TOMADO DEL INSTRUCTIVO PROPORCIONADO POR EL PROVEEDOR.

6.4.2.5 MÉTODO DEL PICRATO ALCALINO PARA LA DETERMINACIÓN DE CREATININA.

FUNDAMENTO DEL MÉTODO.

La creatinina presente en la muestra reacciona con el picrato en medio alcalino originando un complejo coloreado. Se mide la velocidad de formación de dicho complejo en periodos iniciales cortos (6 minutos), evitándose así la interferencia de otros compuestos. Se mide a una longitud de onda (λ) de $500 \pm 20\text{nm}$.

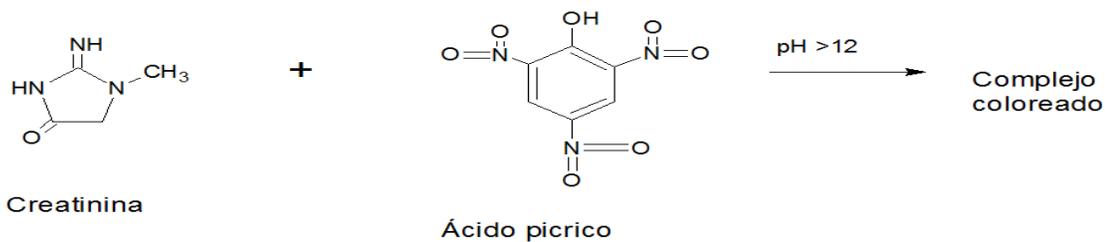
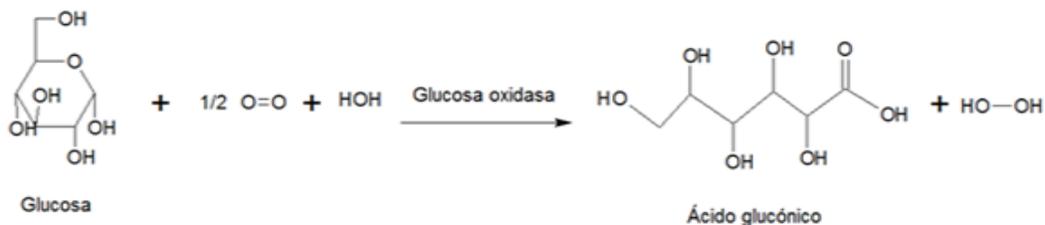


Ilustración 10. REACCIÓN ASOCIADA AL MÉTODO DEL PICRATO ALCALINO PARA DETERMINACIÓN DE CREATININA. TOMADO DEL INSTRUCTIVO PROPORCIONADO POR EL PROVEEDOR.

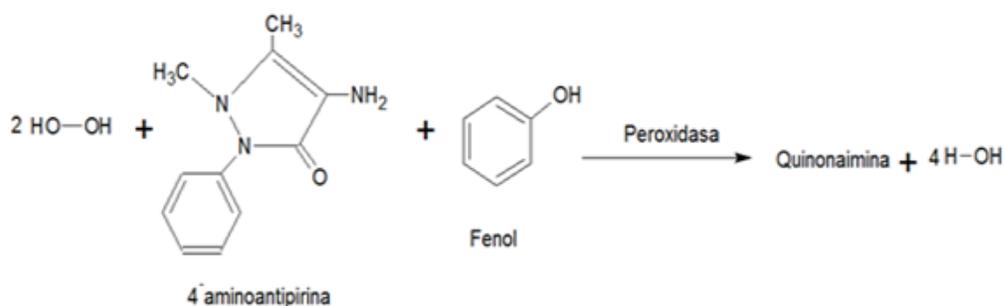
6.4.2.6 MÉTODO DE LA GLUCOSA-OXIDASA-PERÓXIDASA PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA.

FUNDAMENTO DEL MÉTODO.

La glucosa presente en la muestra origina, según las reacciones acopladas descritas a continuación, un complejo coloreado que se cuantifica por fotometría, medido a una longitud de onda (λ) de $500 \pm 20\text{nm}$.



La glucosa oxidasa remueve dos hidrógenos de la glucosa, reduciéndose. La forma reducida de la enzima luego se re-oxida con oxígeno molecular generando peróxido de hidrógeno.



b. El peróxido de hidrógeno junto con 4-aminoantipirina da lugar a la formación de una quinona. La quinona formada es proporcional a la concentración de glucosa en la muestra.

Ilustración 11. REACCIONES ASOCIADAS AL MÉTODO GLUCOSA-OXIDASA-PEROXIDASA PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA. TOMADO DEL INSTRUCTIVO PROPORCIONADO POR EL PROVEEDOR.

6.4.2.7 MÉTODO DE BIURET PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL.

FUNDAMENTO DEL MÉTODO.

La proteína presente en la muestra reacciona con los iones cobre (II) en medio alcalino, originando un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría, medido a una longitud de onda (λ) de $545 \pm 20\text{nm}$.

La reacción se basa en la formación de un compuesto de color violeta, debido a la formación de un complejo de coordinación entre los iones Cu^{2+} y los pares de electrones no compartidos del nitrógeno que forma parte de los enlaces peptídicos.

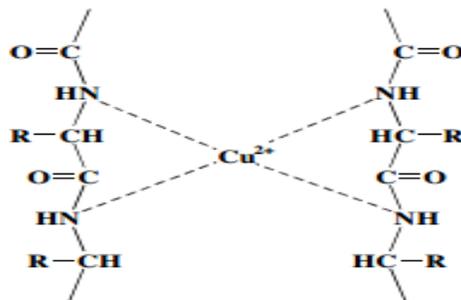
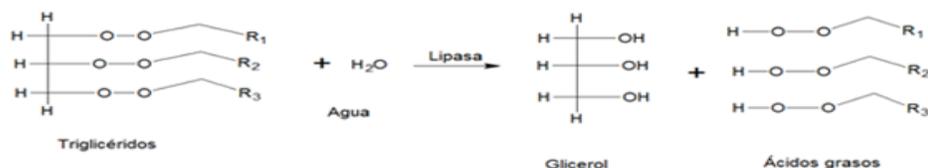


Ilustración 12. REACCIÓN ASOCIADA AL MÉTODO DE BIURET PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL. TOMADO DEL INSTRUCTIVO PROPORCIONADO POR EL PROVEEDOR.

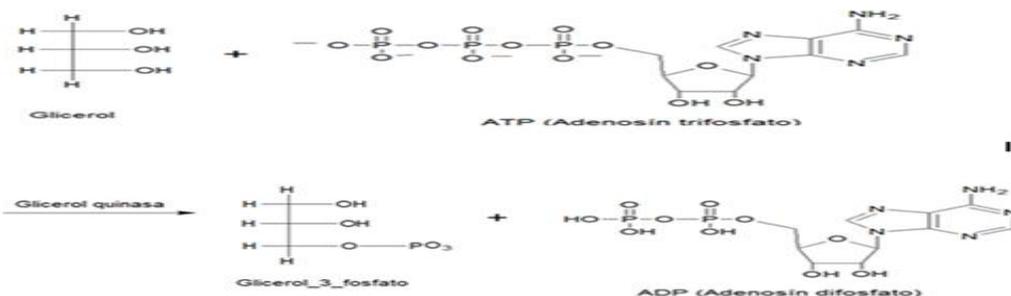
6.4.2.8 MÉTODO DEL GLICEROL-FOSFATO-OXIDASA/PEROXIDASA PARA LA DETERMINACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS.

FUNDAMENTO DEL MÉTODO.

Los triglicéridos presentes en la muestra originan, según las reacciones acopladas descritas a continuación, un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría, medido a una longitud de onda (λ) de $500 \pm 20\text{nm}$.



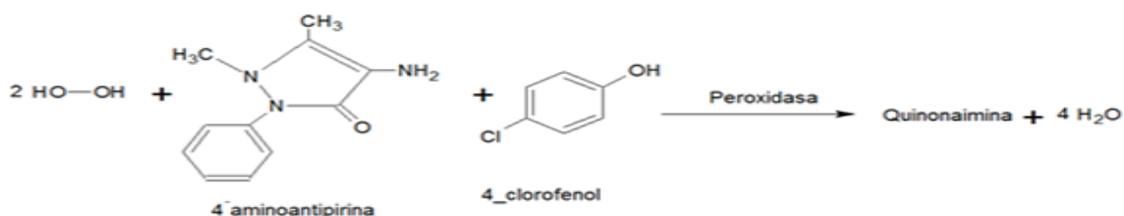
- a. Los triglicéridos se hidrolizan por una lipasa para producir glicerol y ácidos grasos.



- b. El glicerol se fosforila dando lugar a la formación de glicerol-3-fosfato, transformando el ATP en ADP.



- c. El glicerol-3-fosfato es oxidado a dihidroxiacetona fosfato por la enzima glicerol-3-fosfato-oxidasa.



- d. El peróxido de hidrogeno reacciona con la 4-aminoantipirina y el 4-clorofenol para producir por medio de la enzima Peroxidasa, un compuesto coloreado.

Ilustración 13. REACCIONES ASOCIADAS AL MÉTODO GLICEROL-FOSFATO-OXIDASA/PEROXIDASA PARA LA DETERMINACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS. TOMADO DEL INSTRUCTIVO PROPORCIONADO POR EL PROVEEDOR.

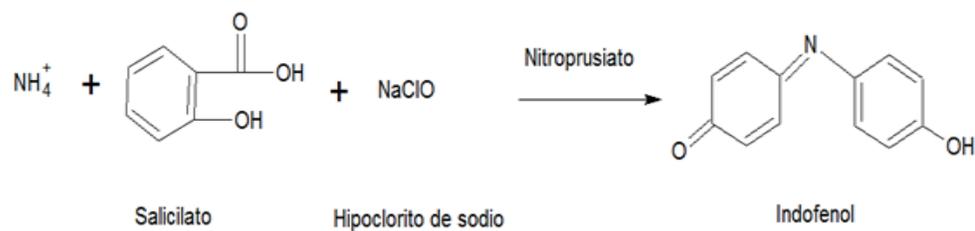
6.4.2.9 MÉTODO DE LA UREASA-SALICILATO PARA LA DETERMINACIÓN DE UREA/BUN.

FUNDAMENTO DEL MÉTODO.

La urea presente en la muestra origina, según las reacciones descritas a continuación, un indofenol coloreado que se cuantifica espectrofotométricamente. Se mide a una longitud de onda (λ) de $600 \pm 20\text{nm}$.



- a.....La ureasa cataliza la hidrólisis de la urea en amoníaco y anhídrido carbónico.



b. El amonio producido reacciona con salicilato e hipoclorito en ambiente alcalino, formándose un indofenol coloreado.

Ilustración 14. REACCIONES ASOCIADAS AL MÉTODO DE LA UREASA-SALICILATO PARA LA DETERMINACIÓN DE UREA/BUN. TOMADO DEL INSTRUCTIVO PROPORCIONADO POR EL PROVEEDOR.

6.4.3 IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA.

Para implementar la metodología del análisis de los nueve (9) componentes de química sanguínea que se analizarán en el **CIDAR**, se variaron tres (3) de los parámetros establecidos en el equipo, para encontrar las condiciones apropiadas que garanticen un alto grado de confiabilidad, precisión y exactitud.

Los tres (3) parámetros que se variaron fueron temperatura (°C), longitud de onda (nm) y volumen de muestra (µl). Se realizaron tres (3) repeticiones para cada una de las determinaciones, para garantizar resultados confiables.

Las variaciones se realizaron de acuerdo al siguiente esquema, para cada una de las pruebas:

a. ALT/GPT, AST/GOT, CK:

LONGITUD DE ONDA (λ)	TEMPERATURA (°C)	VOLUMEN DE MUESTRA (µL)
340nm	NO PROGRAMADA	300,400,500
	25	300,400,500
	37	300,400,500

Tabla 8. ESQUEMA DE LAS VARIACIONES DE LOS PARAMETROS PARA ALT/GPT, AST/GOT Y CK.

b. CREATININA:

LONGITUD DE ONDA (λ)	TEMPERATURA (°C)	VOLUMEN DE MUESTRA (μL)
505nm	NO PROGRAMADA	300,400,500
	25	300,400,500
	37	300,400,500
435nm	NO PROGRAMADA	300,400,500
	25	300,400,500
	37	300,400,500

Tabla 9. ESQUEMA DE LAS VARIACIONES DE LOS PARAMETROS PARA CREATININA.

c. COLESTEROL, TRIGLICERIDOS Y GLUCOSA:

LONGITUD DE ONDA (λ)	TEMPERATURA (°C)	VOLUMEN DE MUESTRA (μL)
505nm	NO PROGRAMADA	300, 400, 500
	25	300, 400, 500
	37	300, 400, 500
535nm	NO PROGRAMADA	300, 400, 500
	25	300, 400, 500
	37	300, 400, 500

Tabla 10. ESQUEMA DE LAS VARIACIONES DE LOS PARAMETROS PARA COLESTEROL, TRIGLICERIDOS Y GLUCOSA.

d. UREA:

LONGITUD DE ONDA (λ)	TEMPERATURA (°C)	VOLUMEN DE MUESTRA (μL)
560nm	NO PROGRAMADA	300, 400, 500
	25	300, 400, 500
	37	300, 400, 500
600nm	NO PROGRAMADA	300, 400, 500
	25	300, 400, 500
	37	300, 400, 500
535nm	NO PROGRAMADA	300, 400, 500
	25	300, 400, 500
	37	300, 400, 500

Tabla 11. ESQUEMA DE LAS VARIACIONES DE LOS PARAMETROS PARA UREA/BUN.

e. PROTEINA TOTAL:

LONGITUD DE ONDA (λ)	TEMPERATURA (°C)	VOLUMEN DE MUESTRA (μL)
505nm	NO PROGRAMADA	300, 400, 500
	25	300, 400, 500
	37	300, 400, 500
535nm	NO PROGRAMADA	300, 400, 500
	25	300, 400, 500
	37	300, 400, 500
560nm	NO PROGRAMADA	300, 400, 500
	25	300, 400, 500
	37	300, 400, 500

Tabla 12. ESQUEMA DE LAS VARIACIONES DE LOS PARAMETROS PARA PROTEINA TOTAL.

6.4.4 REACTIVOS.

a. ALT/GPT:

Reactivo A. Tris 150 mmol/L, L-alanina 750 mmol/L, lactato deshidrogenasa > 1350 U/L, pH 7,3.

Reactivo B. NADH 1,3 mmol/L, 2-oxoglutarato 75 mmol/L, hidróxido sódico 148 mmol/L, sodio azida 9,5 g/L.

b. AST/GOT:

Reactivo A. Tris 121 mmol/L, L-aspartato 362 mmol/L, malato deshidrogenasa > 460 U/L, lactato deshidrogenasa > 660 U/L, hidróxido sódico 225 mmol/L, pH 7,8.

Reactivo B. NADH 1,3 mmol/L, 2-oxoglutarato 75 mmol/L, hidróxido sódico 148 mmol/L, sodio azida 9,5 g/L.

c. CREATININA:

Reactivo A. Hidróxido sódico 0,4 mol/L, detergente.

Reactivo B. Ácido pícrico 25 mmol/L.

d. CK:

Reactivo A. Imidazol 125 mmol/L, EDTA 2 mmol/L, acetato de magnesio 12,5 mmol/L, D-glucosa 25 mmol/L, N-acetilcisteína 25 mmol/L, hexoquinasa 6000 U/L, NADP 2,4 mmol/L, pH 6,7.

Reactivo B. Fosfato de creatina 250 mmol/L, ADP 15 mmol/L, AMP 25 mmol/L, P1,P5-di(adenosina-5-)pentafofato 102 µmol/L, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 8000 U/L.

e. GLUCOSA:

Reactivo A. Fosfatos 100 mmol/L, fenol 5 mmol/L, glucosa oxidasa > 10 U/mL, peroxidasa > 1 U/mL, 4-aminoantipirina 0,4 mmol/L, pH 7,5.

f. COLESTEROL:

Reactivo A. Pipes 35 mmol/L, colato sódico 0,5 mmol/L, fenol 28 mmol/L, colesterol esterasa > 0,2 U/mL, colesterol oxidasa > 0,1 U/mL, peroxidasa > 0,8 U/mL, 4-aminoantipirina 0,5 mmol/L, pH 7,0.

g. TRIGLICÉRIDOS:

Reactivo A. Pipes 45 mmol/L, 4-clorofenol 6 mmol/L, cloruro magnésico 5 mmol/L, lipasa > 100 U/mL, glicerol quinasa > 1,5 U/mL, glicerol-3-fosfato oxidasa > 4 U/mL, peroxidasa > 0,8 U/mL, 4-aminoantipirina 0,75mmol/L, ATP 0,9 mmol/L, pH 7,0.

h. UREA/BUN:

Reactivo A1. Salicilato sódico 62 mmol/L, nitroprusiato sódico 3,4 mmol/L, tampón fosfatos 20 mmol/L, pH 6,9.

Reactivo A2. Ureasa > 500U/mL

Reactivo B. Hipoclorito sódico 7 mmol/L, hidróxido sódico 150 mmol/L.

i. PROTEÍNA TOTAL:

Reactivo A. Acetato de cobre (II) 6 mmol/L, yoduro de potasio 12 mmol/L, hidróxido sódico 1,15 mol/L, detergente.

6.4.5 PROCEDIMIENTOS.

- **Procedimiento para medir ALT/GPT, AST/GOT y CK.**

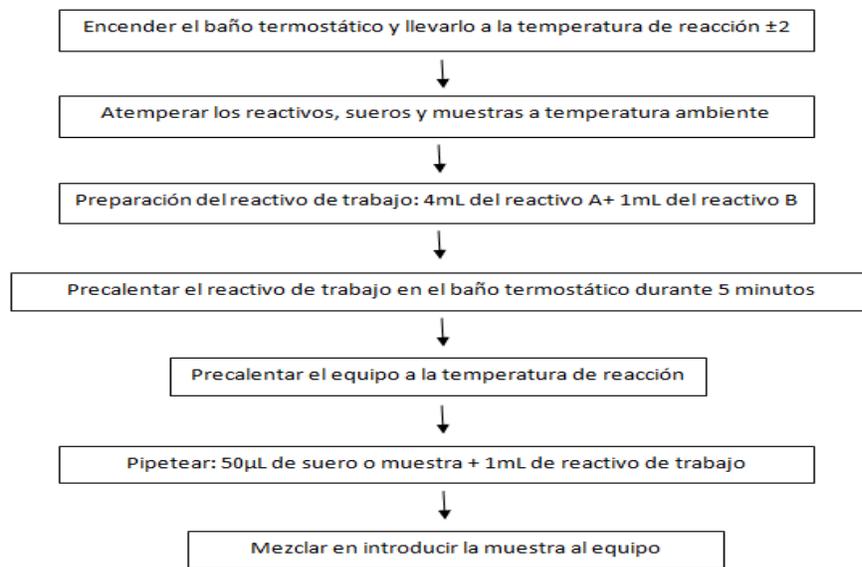


Ilustración 15. DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCEDIMIENTO PARA MEDIR ALT/GPT, AST/GOT Y CK.

- **Procedimiento para medir CREATININA.**

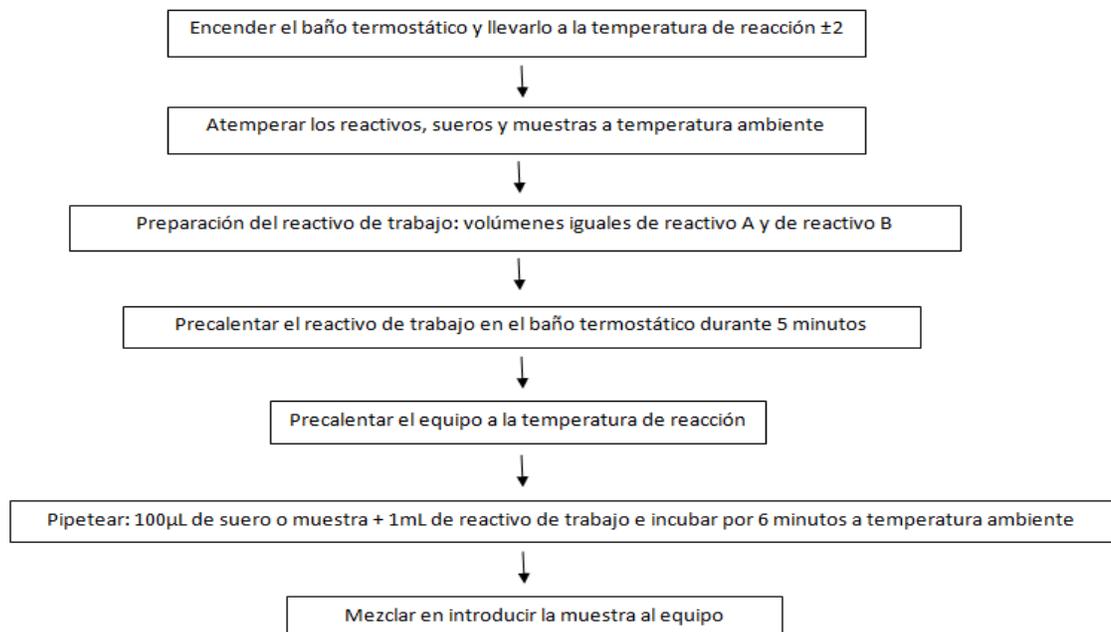


Ilustración 16. DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCEDIMIENTO PARA MEDIR CREATININA.

- **Procedimiento para medir GLUCOSA, COLESTEROL y TRIGLICÉRIDOS.**

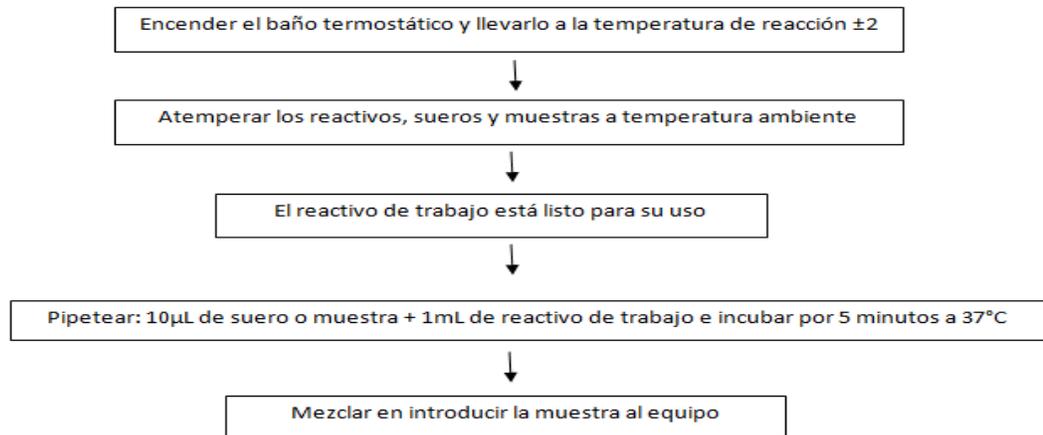


Ilustración 17. DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCEDIMIENTO PARA MEDIR GLUCOSA, COLESTEROL Y TRIGLICÉRIDOS.

- **Procedimiento para medir UREA/BUN.**

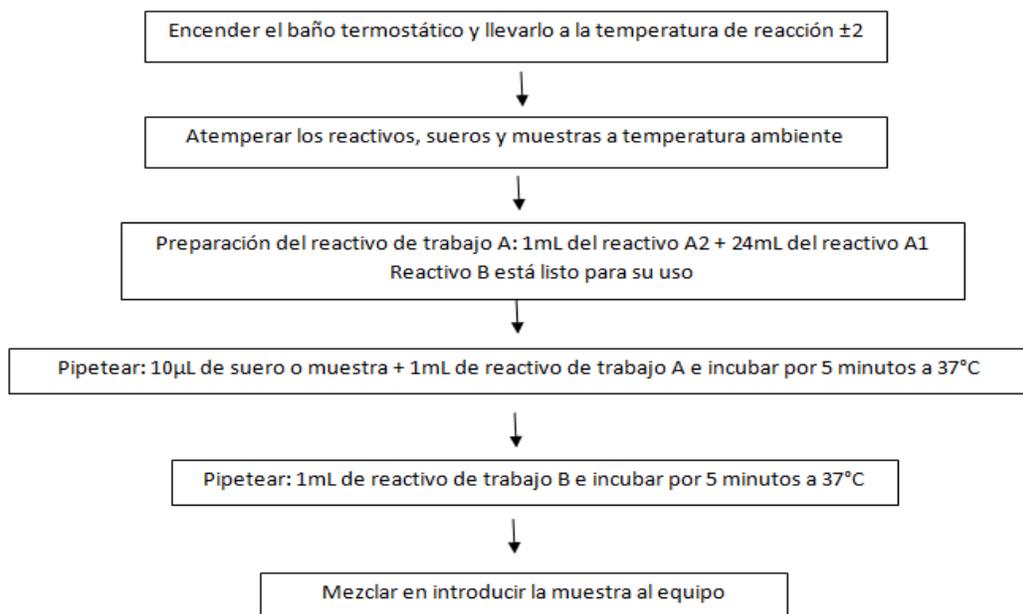


Ilustración 18. DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCEDIMIENTO PARA MEDIR UREA/BUN

- **Procedimiento para medir PROTEÍNA TOTAL.**

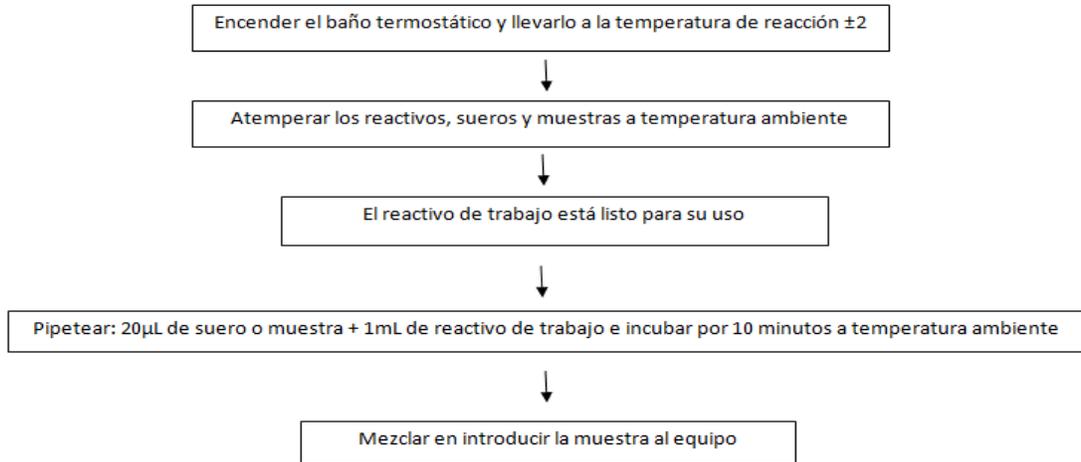


Ilustración 19. DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCEDIMIENTO PARA MEDIR PROTEÍNA TOTAL

7 RESULTADOS Y DISCUSIONES.

7.1 VARIACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES.

Se variaron los parámetros de análisis para cada uno de los analitos con el fin de encontrar las condiciones experimentales adecuadas.

Para cada analito se mide la concentración conocida en el Suero Control de Bioquímica, a diferentes condiciones experimentales (temperatura de reacción en °C, longitud de onda en nm y volumen de muestra en µL). Con base en los resultados obtenidos y en el análisis estadístico de los mismos, se proceden a implementar las condiciones para cada análisis y la metodología a seguir. A continuación se describen los resultados obtenidos:

7.1.1 VARIACIÓN DE LOS PARÁMETROS PARA LA MEDICIÓN DE ALT/GPT.

						VALOR REAL (U/L)	32,5	
LONGITUD DE ONDA (λ)	TEMPERATURA (°C)	VOLUMEN DE MUESTRA (µL)	RESULTADOS OBTENIDOS (U/L)			MEDIA (m)	DESVIACIÓN ESTANDAR (s)	DIFERENCIA PORCENTUAL (%)
340nm	No programada	300	17	17	18	17,3333333	0,577350269	46,6666667
		400	18	20	21	19,6666667	1,527525232	39,48717949
		500	20	19	19	19,3333333	0,577350269	40,51282051
	25	300	26	23	23	24	1,732050808	26,15384615
		400	24	22	21	22,3333333	1,527525232	31,28205128
		500	26	29	26	27	1,732050808	16,92307692
	37	300	38	35	34	35,6666667	2,081665999	9,743589744
		400	34	33	32	33	1	1,538461538
		500	37	37	36	36,6666667	0,577350269	12,82051282

Tabla 13. RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA VARIACION DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES EN LA MEDICIÓN DE ALT/GPT.

7.1.2 VARIACIÓN DE LOS PARÁMETROS PARA LA MEDICIÓN DE AST/GOT.

						VALOR REAL (U/L)	45,2	
LONGITUD DE ONDA (Å)	TEMPERATURA (°C)	VOLUMEN DE MUESTRA (µL)	RESULTADOS OBTENIDOS (U/L)			MEDIA (m)	DESVIACIÓN ESTANDAR (s)	DIFERENCIA PORCENTUAL (%)
340nm	No programada	300	25	25	27	25,6666667	1,154700538	43,21533923
		400	17	20	19	18,6666667	1,527525232	58,7020649
		500	20	22	19	20,3333333	1,527525232	55,01474926
	25	300	29	30	35	31,3333333	3,214550254	30,67846608
		400	21	19	25	21,6666667	3,055050463	52,06489676
		500	28	27	32	29	2,645751311	35,84070796
	37	300	39	51	42	44	6,244997998	2,654867257
		400	43	45	46	44,6666667	1,527525232	1,179941003
		500	37	48	40	41,6666667	5,686240703	7,817109145

Tabla 14. RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA VARIACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES EN LA MEDICIÓN DE AST/GOT.

7.1.3 VARIACIÓN DE LOS PARÁMETROS PARA LA MEDICIÓN DE CK.

						VALOR REAL (U/L)	188	
LONGITUD DE ONDA (Å)	TEMPERATURA (°C)	VOLUMEN DE MUESTRA (µL)	RESULTADOS OBTENIDOS (U/L)			MEDIA (m)	DESVIACIÓN ESTANDAR (s)	DIFERENCIA PORCENTUAL (%)
340nm	No programada	300	65	65	64	64,6666667	0,577350269	65,60283688
		400	73	75	71	73	2	61,17021277
		500	75	76	75	75,3333333	0,577350269	59,92907801
	25	300	80	80	75	78,3333333	2,886751346	58,33333333
		400	82	83	83	82,6666667	0,577350269	56,02836879
		500	93	95	96	94,6666667	1,527525232	49,64539007
	37	300	165	167	165	165,6666667	1,154700538	11,87943262
		400	183	182	183	182,6666667	0,577350269	2,836879433
		500	182	180	179	180,3333333	1,527525232	4,078014184

Tabla 15. RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA VARIACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES EN LA MEDICIÓN DE CK.

7.1.4 VARIACIÓN DE LOS PARÁMETROS PARA LA MEDICIÓN DE CREATININA.

							VALOR REAL (mg/dL)	1,57
LONGITUD DE ONDA (Å)	TEMPERATURA (°C)	VOLUMEN DE MUESTRA (µL)	RESULTADOS OBTENIDOS (mg/dL)			MEDIA (m)	DESVIACIÓN ESTANDAR (s)	DIFERENCIA PORCENTUAL (%)
505nm	No programada	300	0,92	0,91	0,92	0,91666667	0,005773503	41,61358811
		400	0,53	0,52	0,53	0,52666667	0,005773503	66,45435244
		500	0,71	0,71	0,69	0,70333333	0,011547005	55,20169851
	25	300	0,41	0,4	0,42	0,41	0,01	73,88535032
		400	0,29	0,31	0,3	0,3	0,01	80,89171975
		500	0,39	0,36	0,35	0,36666667	0,02081666	76,64543524
	37	300	1,23	1,21	1,2	1,21333333	0,015275252	22,71762208
		400	1,51	1,49	1,48	1,49333333	0,015275252	4,883227176
		500	1,53	1,5	1,56	1,53	0,03	2,547770701
535nm	No programada	300	0,33	0,34	0,34	0,33666667	0,005773503	78,55626327
		400	0,38	0,39	0,37	0,38	0,01	75,79617834
		500	0,41	0,42	0,41	0,41333333	0,005773503	73,67303609
	25	300	0,25	0,27	0,27	0,26333333	0,011547005	83,22717622
		400	0,23	0,19	0,21	0,21	0,02	86,62420382
		500	0,21	0,24	0,23	0,22666667	0,015275252	85,5626327
	37	300	0,93	0,92	0,92	0,92333333	0,005773503	41,18895966
		400	0,89	0,91	0,88	0,89333333	0,015275252	43,09978769
		500	0,88	0,87	0,87	0,87333333	0,005773503	44,37367304

Tabla 16. RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA VARIACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES EN LA MEDICIÓN DE CREATININA.

7.1.5 VARIACIÓN DE LOS PARÁMETROS PARA LA MEDICIÓN DE GLUCOSA.

							VALOR REAL (mg/dL)	83,6
LONGITUD DE ONDA (Å)	TEMPERATURA (°C)	VOLUMEN DE MUESTRA (µL)	RESULTADOS OBTENIDOS (mg/dL)			MEDIA (m)	DESVIACIÓN ESTANDAR (s)	DIFERENCIA PORCENTUAL (%)
505nm	No programada	300	81	81	84	82	1,732050808	1,913875598
		400	83	83	84	83,3333333	0,577350269	0,318979266
		500	84	85	85	84,6666667	0,577350269	1,275917065
	25	300	73	75	75	74,3333333	1,154700538	11,08452951
		400	88	88	88	88	0	5,263157895
		500	92	90	89	90,3333333	1,527525232	8,054226475
	37	300	69	68	65	67,3333333	2,081665999	19,45773525
		400	77	79	76	77,3333333	1,527525232	7,496012759
		500	73	73	73	73	0	12,67942584
535nm	No programada	300	54	53	50	52,3333333	2,081665999	37,40031898
		400	63	64	64	63,6666667	0,577350269	23,84370016
		500	59	56	58	57,6666667	1,527525232	31,02073365
	25	300	50	50	48	49,3333333	1,154700538	40,98883573
		400	60	63	63	62	1,732050808	25,83732057
		500	55	50	49	51,3333333	3,214550254	38,59649123
	37	300	51	52	49	50,6666667	1,527525232	39,39393939
		400	66	67	67	66,6666667	0,577350269	20,25518341
		500	55	62	61	59,3333333	3,785938897	29,02711324

Tabla 17. RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA VARIACION DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES EN LA MEDICIÓN DE GLUCOSA.

7.1.6 VARIACIÓN DE LOS PARÁMETROS PARA LA MEDICIÓN DE COLESTEROL.

LONGITUD DE ONDA (Å)	TEMPERATURA (°C)	VOLUMEN DE MUESTRA (µL)	RESULTADOS OBTENIDOS (mg/dL)			MEDIA (m)	VALOR REAL (mg/dL)	156
							DESVIACIÓN ESTANDAR (s)	DIFERENCIA PORCENTUAL (%)
505nm	No programada	300	161	157	158	158,666667	2,081665999	1,709401709
		400	153	161	156	156,666667	4,041451884	0,427350427
		500	165	162	163	163,333333	1,527525232	4,700854701
	25	300	149	147	150	148,666667	1,527525232	4,700854701
		400	154	154	150	152,666667	2,309401077	2,136752137
		500	168	160	163	163,666667	4,041451884	4,914529915
	37	300	161	161	160	160,666667	0,577350269	2,991452991
		400	162	158	155	158,333333	3,511884584	1,495726496
		500	171	175	174	173,333333	2,081665999	11,111111111
535nm	No programada	300	79	77	75	77	2	50,64102564
		400	80	80	80	80	0	48,71794872
		500	75	77	74	75,3333333	1,527525232	51,70940171
	25	300	91	93	89	91	2	41,66666667
		400	101	102	103	102	1	34,61538462
		500	87	88	80	85	4,358898944	45,51282051
	37	300	89	88	85	87,3333333	2,081665999	44,01709402
		400	93	95	101	96,3333333	4,163331999	38,24786325
		500	75	83	82	80	4,358898944	48,71794872

Tabla 18. RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA VARIACION DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES EN LA MEDICIÓN DE COLESTEROL.

7.1.7 VARIACIÓN DE LOS PARÁMETROS PARA LA MEDICIÓN DE TRIGLICÉRIDOS.

							VALOR REAL (mg/dL)	52,3
LONGITUD DE ONDA (Å)	TEMPERATURA (°C)	VOLUMEN DE MUESTRA (µL)	RESULTADOS OBTENIDOS (mg/dL)			MEDIA (m)	DESVIACIÓN ESTANDAR (s)	DIFERENCIA PORCENTUAL (%)
505nm	No programada	300	46	44	53	47,6666667	4,725815626	8,859145953
		400	54	48	53	51,6666667	3,214550254	1,210962396
		500	56	51	53	53,3333333	2,516611478	1,975780752
	25	300	39	38	34	37	2,645751311	29,2543021
		400	46	45	44	45	1	13,95793499
		500	43	47	40	43,3333333	3,511884584	17,14467814
	37	300	40	42	42	41,3333333	1,154700538	20,96876992
		400	50	50	49	49,6666667	0,577350269	5,035054175
		500	48	53	42	47,6666667	5,507570547	8,859145953
535nm	No programada	300	8	8	7	7,6666667	0,577350269	85,34098152
		400	12	12	9	11	1,732050808	78,96749522
		500	11	12	9	10,6666667	1,527525232	79,60484385
	25	300	5	4	4	4,3333333	0,577350269	91,71446781
		400	9	5	11	8,3333333	3,055050463	84,06628426
		500	8	7	5	6,6666667	1,527525232	87,25302741
	37	300	23	20		14,3333333	2,121320344	72,59400892
		400	33	32	29	31,3333333	2,081665999	40,08922881
		500	29	27	35	30,3333333	4,163331999	42,0012747

Tabla 19. RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA VARIACION DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES EN LA MEDICIÓN DE TRIGLICÉRIDOS.

7.1.8 VARIACIÓN DE LOS PARÁMETROS PARA LA MEDICIÓN DE UREA/BUN.

LONGITUD DE ONDA (Å)	TEMPERATURA (°C)	VOLUMEN DE MUESTRA (µL)	RESULTADOS OBTENIDOS (mg/dL)			MEDIA (m)	VALOR REAL (mg/dL)	28,5
							DESVIACIÓN ESTANDAR (s)	DIFERENCIA PORCENTUAL (%)
560nm	No programada	300	10	9	9	9,33333333	0,577350269	67,25146199
		400	12	13	13	12,66666667	0,577350269	55,55555556
		500	11	11	10	10,66666667	0,577350269	62,57309942
	25	300	10	9	10	9,66666667	0,577350269	66,08187135
		400	12	12	12	12	0	57,89473684
		500	10	11	11	10,66666667	0,577350269	62,57309942
	37	300	5	4	5	4,66666667	0,577350269	83,62573099
		400	7	7	7	7	0	75,43859649
		500	6	5	6	5,66666667	0,577350269	80,11695906
600nm	No programada	300	24	24	25	24,33333333	0,577350269	14,61988304
		400	29	29	29	29	0	1,754385965
		500	25	26	26	25,66666667	0,577350269	9,941520468
	25	300	23	21	23	22,33333333	1,154700538	21,6374269
		400	26	26	26	26	0	8,771929825
		500	24	23	24	23,66666667	0,577350269	16,95906433
	37	300	20	21	20	20,33333333	0,577350269	28,65497076
		400	32	32	32	32	0	12,28070175
		500	23	22	23	22,66666667	0,577350269	20,46783626
635nm	No programada	300	53	54	54	53,66666667	0,577350269	88,30409357
		400	50	50	49	49,66666667	0,577350269	74,26900585
		500	52	52	52	52	0	82,45614035
	25	300	53	53	52	52,66666667	0,577350269	84,79532164
		400	55	50	50	51,66666667	2,886751346	81,28654971
		500	51	52	53	52	1	82,45614035
	37	300	45	44	44	44,33333333	0,577350269	55,55555556
		400	41	42	41	41,33333333	0,577350269	45,02923977
		500	43	43	43	43	0	50,87719298

Tabla 20. RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA VARIACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES EN LA MEDICIÓN DE UREA/BUN.

7.1.9 VARIACIÓN DE LOS PARÁMETROS PARA LA MEDICIÓN DE PROTEÍNA TOTAL.

LONGITUD DE ONDA (Å)	TEMPERATURA (°C)	VOLUMEN DE MUESTRA (µL)	RESULTADOS OBTENIDOS (g/L)			MEDIA (m)	VALOR REAL (g/L)	50,9
							DESVIACIÓN ESTANDAR (s)	DIFERENCIA PORCENTUAL (%)
505nm	No programada	300	33	34	37	34,6666667	2,081665999	31,89259987
		400	32	32	33	32,3333333	0,577350269	36,4767518
		500	35	35	35	35	0	31,23772102
	25	300	36	36	34	35,3333333	1,154700538	30,58284217
		400	35	35	35	35	0	31,23772102
		500	37	36	37	36,6666667	0,577350269	27,96332678
	37	300	35	34	36	35	1	31,23772102
		400	34	35	35	34,6666667	0,577350269	31,89259987
		500	37	37	35	36,3333333	1,154700538	28,61820563
535nm	No programada	300	52	51	48	50,3333333	2,081665999	1,113294041
		400	51	52	51	51,3333333	0,577350269	0,851342502
		500	52	53	53	52,6666667	0,577350269	3,470857891
	25	300	50	51	49	50	1	1,768172888
		400	49	47	47	47,6666667	1,154700538	6,35232482
		500	53	53	50	52	1,732050808	2,161100196
	37	300	50	50	48	49,3333333	1,154700538	3,077930583
		400	49	49	48	48,6666667	0,577350269	4,387688278
		500	53	54	54	53,6666667	0,577350269	5,435494434
560nm	No programada	300	52	52	52	52	0	2,161100196
		400	57	57	57	57	0	11,98428291
		500	55	55	56	55,3333333	0,577350269	8,709888671
	25	300	55	57	57	56,3333333	1,154700538	10,67452521
		400	53	52	53	52,6666667	0,577350269	3,470857891
		500	60	61	60	60,3333333	0,577350269	18,53307138
	37	300	57	58	58	57,6666667	0,577350269	13,2940406
		400	54	56	55	55	1	8,055009823
		500	60	61	63	61,3333333	1,527525232	20,49770792

Tabla 21. RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA VARIACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES EN LA MEDICIÓN DE PROTEÍNA TOTAL.

7.2 ELECCIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES ADECUADAS.

Con base en la variación de parámetros, se proceden a analizar las diferencias porcentuales de los resultados obtenidos para la concentración del analito en la muestra con el valor real del mismo. A partir del experimento que presenta la menor diferencia porcentual del dato real, se obtienen las condiciones apropiadas para realizar cada uno de los análisis. Los resultados se presentan a continuación:

ANALITO	LONGITUD DE ONDA (λ)	TEMPERATURA (°C)	VOLUMEN DE MUESTRA (μL)	RESULTADO OBTENIDO	VALOR REAL	UNIDADES	DIFERENCIA PORCENTUAL (%)
ALT/GPT	340nm	37	400	33	32,5	U/L	1,538461538
AST/GOT	340nm	37	400	44,6666667	45,2	U/L	1,179941003
CK	340nm	37	400	182,666667	188	U/L	2,836879433
CREATININA	505nm	37	500	1,53	1,57	mg/dL	2,547770701
GLUCOSA	505nm	No programada	400	83,3333333	83,6	mg/dL	0,318979266
COLESTEROL	505nm	No programada	400	156,666667	156	mg/dL	0,427350427
TRIGLICÉRIDOS	505nm	No programada	400	51,6666667	52,3	mg/dL	1,210962396
UREA/BUN	600nm	No programada	400	29	28,5	mg/dL	1,754385965
PROTEÍNA TOTAL	535nm	No programada	400	51,3333333	50,9	g/L	0,851342502

Tabla 22. ELECCIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES ADECUADAS PARA CADA ANALITO CON BASE EN LA DIFERENCIA PORCENTUAL DEL VALOR OBTENIDO EN CADA EXPERIEMIENTO CON RESPECTO AL VALOR REAL DEL ANALITO EN LA MUESTRA.

7.3 PARÁMETROS DE CALIDAD ANALÍTICA.

En aras de garantizar que cada uno de los métodos instrumentales que fueron objeto de análisis de estudio y experimentación, sean adecuados para la medición de cada analito en suero sanguíneo, se proceden a analizar numéricamente características que avalen la calidad analítica de las mediciones; estas características son precisión (reproducibilidad), sesgo, sensibilidad, límites de detección y cuantificación.

7.3.1 PRECISIÓN.

Con base en la definición dada en el apartado 5.4.1 para la precisión, se determina ésta para cada uno de los métodos en términos de repetibilidad. A partir

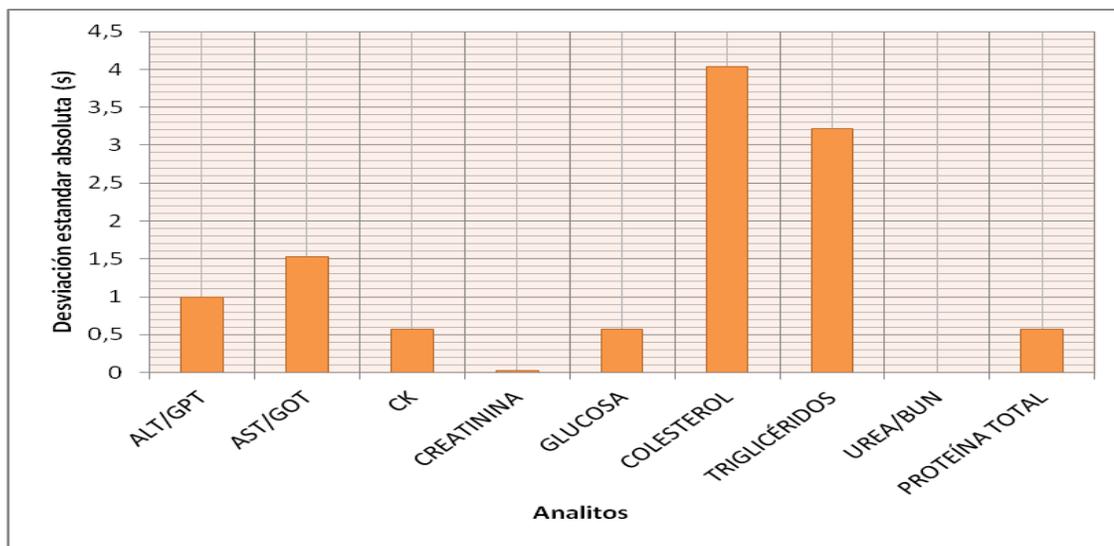
de la población de datos obtenidos, bajo las mismas condiciones experimentales, se proceden a determinar los parámetros de calidad, tales como desviación estándar absoluta (s), desviación estándar relativa (DER), coeficiente de variación (CV) y varianza (s²). Los valores obtenidos aquí nos darán un estimativo de la precisión con la cual se podrá realizar cada análisis.

La población muestral elegida para cada método, es la que presentó menor diferencia porcentual en el experimento de variación de parámetros del instrumento. A continuación los resultados obtenidos.

ANALITO	UNIDADES	RESULTADOS OBTENIDOS			MEDIA (m)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR ABSOLUTA (s)	DESVIACIÓN ESTANDAR RELATIVA (DER)	COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV)	VARIANZA (s ²)
ALT/GPT	U/L	34	33	32	33	1	0,03030303	3,0303030%	1
AST/GOT	U/L	43	45	46	44,6666667	1,527525232	0,034198326	3,4198326%	2,33333333
CK	U/L	183	182	183	182,666667	0,577350269	0,003160677	0,3160677%	0,33333333
CREATININA	mg/dL	1,53	1,5	1,56	1,53	0,03	0,019607843	1,9607843%	0,0009
GLUCOSA	mg/dL	83	83	84	83,3333333	0,577350269	0,006928203	0,6928203%	0,33333333
COLESTEROL	mg/dL	153	161	156	156,666667	4,041451884	0,025796501	2,5796501%	16,3333333
TRIGLICÉRIDOS	mg/dL	54	48	53	51,6666667	3,214550254	0,062217102	6,2217102%	10,3333333
UREA/BUN	mg/dL	29	29	29	29	0	0	0,0000000%	0
PROTEÍNA TOTAL	g/L	51	52	51	51,3333333	0,577350269	0,011247083	1,1247083%	0,33333333

Tabla 23. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD DE LA PRECISIÓN PARA CADA UNO DE LOS MÉTODOS.

A continuación se presentan gráficamente los resultados obtenidos y posteriormente el análisis correspondiente a estos datos en términos de la precisión de cada uno de los métodos de medición.



Gráfica 1. GRAFICA DE DESVIACION ESTANDAR ABSOLUTA CORRESPONDIENTES A CADA MÉTODO DE MEDICIÓN EMPLEANDO EL SUERO CONTROL DE BIOQUIMICA.

Como se puede observar en la **gráfica 1**, los métodos para la medición de CK, GLUCOSA Y PROTEÍNA TOTAL presentan un valor numérico muy bajo (<1) para la desviación estándar del conjunto de datos obtenidos experimentalmente; al ser tan bajo este valor, nos da un indicio de la alta precisión con la cual se pueden realizar las mediciones de estos analitos.

En cuanto al método de medición de ALT/GPT, AST/GOT, COLESTEROL Y TRIGLICÉRIDOS, estos presentan un valor ≥ 1 para la desviación absoluta del conjunto de datos; esto indica que la precisión para la medición de estos analitos es menor que para los anteriores métodos. Cabe anotar que los métodos para medir ALT/GPT y AST/GOT presentan un menor valor, por lo cual se podría decir que estos son un poco más precisos que los otros dos.

En cuanto al método para medición de CK, se puede afirmar que es altamente preciso dada la baja desviación estándar que presentó el conjunto de datos; finalmente, para el método de medición de UREA/BUN se encuentra que el método es preciso, presentando una desviación estándar de cero (0).

7.3.2 SESGO.

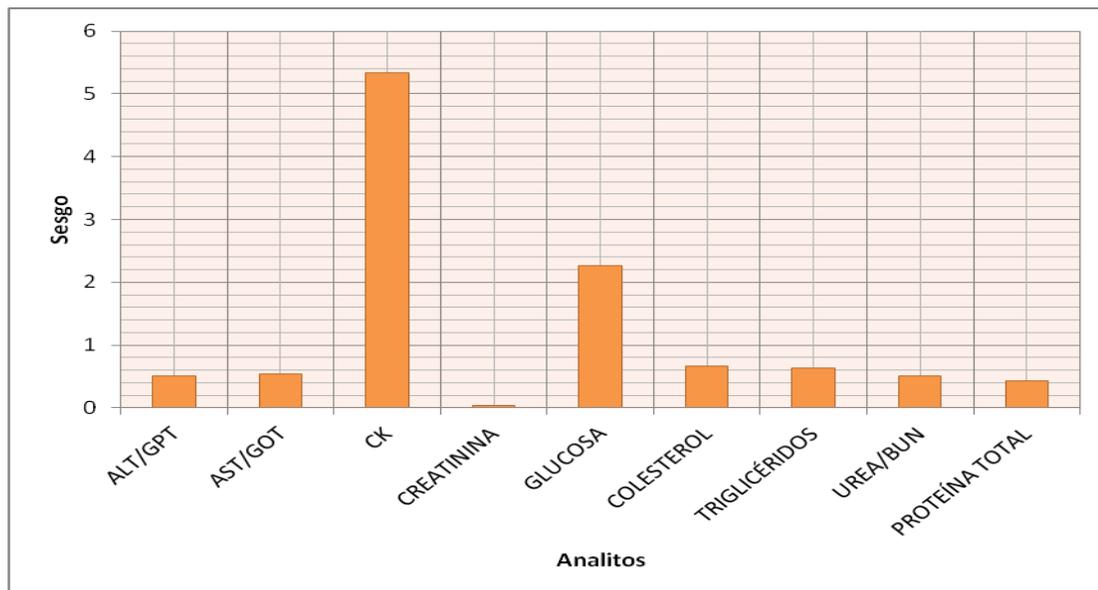
Con base en la definición dada en el apartado 5.4.2 para el sesgo, se procede a determinar el sesgo para cada uno de los métodos.

Para determinar la exactitud hay que analizar uno o varios materiales de referencia cuya concentración de analito es conocida.¹⁰ En este caso, el material de referencia analizado es el Suero Control de Bioquímica. Los resultados obtenidos para el sesgo, se presentan a continuación:

ANALITO	UNIDADES	RESULTADOS OBTENIDOS			MEDIA (m)	VALOR REAL	SESGO
ALT/GPT	U/L	34	33	32	33	32,5	0,5
AST/GOT	U/L	43	45	46	44,6666667	45,2	0,533333333
CK	U/L	183	182	183	182,6666667	188	5,333333333
CREATININA	mg/dL	1,53	1,5	1,56	1,53	1,57	0,04
GLUCOSA	mg/dL	83	83	84	83,3333333	85,6	2,266666667
COLESTEROL	mg/dL	153	161	156	156,6666667	156	0,666666667
TRIGLICÉRIDOS	mg/dL	54	48	53	51,6666667	52,3	0,633333333
UREA/BUN	mg/dL	29	29	29	29	28,5	0,5
PROTEÍNA TOTAL	g/L	51	52	51	51,3333333	50,9	0,433333333

Tabla 24. DETERMINACIÓN DEL SESGO PARA CADA UNO DE LOS MÉTODOS.

A continuación se presentan gráficamente los resultados obtenidos y posteriormente el análisis correspondiente a estos datos en términos de la exactitud de cada uno de los métodos de medición.



Gráfica 2. GRAFICA DE SESGO CORRESPONDIENTES A CADA MÉTODO DE MEDICIÓN.

Al ser el sesgo un estimativo del error que se produce de igual modo en todas las mediciones de cada uno de los analitos, se puede hablar de este en términos de la exactitud con la cual es posible obtener los resultados que serán emitidos por el CIDAR.

En la **GRÁFICA 2** se pueden observar los resultados obtenidos para el sesgo de cada uno de los métodos de medición. Aunque el método CK presenta el más alto valor numérico para sesgo, seguido por el de GLUCOSA, los valores de error sistemático para los métodos objetos de estudio son generalmente bajos y representan que las mediciones se realizaran con una muy buena exactitud, teniendo en cuenta que los esfuerzos deberán centrarse en reducir o eliminar ese sesgo mediante la más cuidadosa calibración del equipo.

7.3.3 SENSIBILIDAD.

Para determinar la sensibilidad de cada uno de los métodos, se construye la curva de calibración y se determina el valor cuantitativo de sensibilidad de calibración mediante las relaciones dadas en el apartado 5.4.3.

Para la construcción de dichas curvas, se toman como patrones los Sueros Control y Calibrador de Bioquímica y una muestra de suero sanguíneo correspondiente a un *canino*. Para conocer la concentración de la muestra de cada uno de los analitos, se realizan mediciones directas de la concentración de los mismos en el equipo, obteniéndose los siguientes resultados:

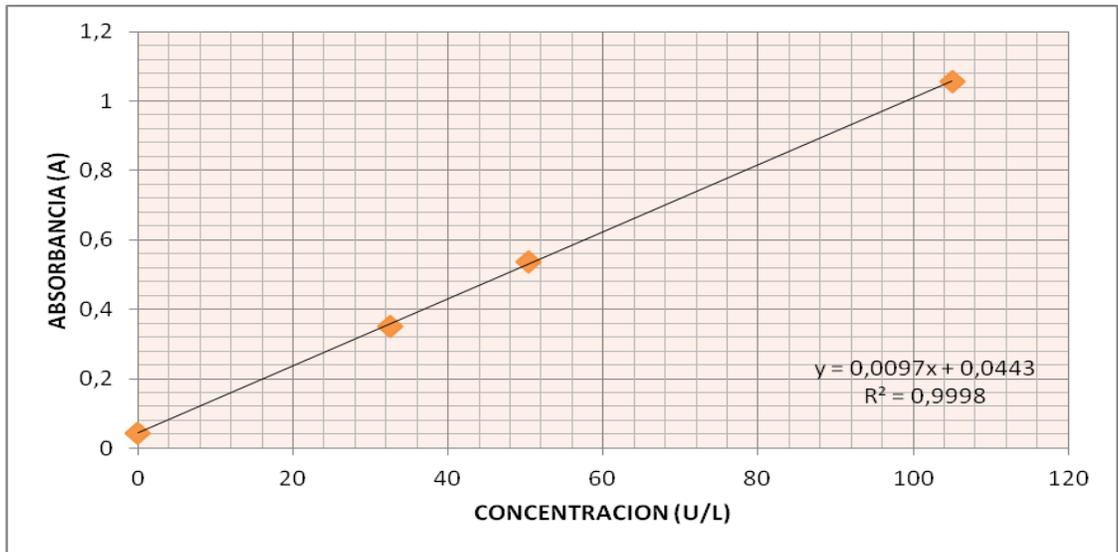
ANALITO	CONCENTRACION	UNIDADES	ABSORBANCIA
ALT/GPT	50,3	U/L	0,538
AST/GOT	53,6	U/L	1,626
CK	258	U/L	0,788
CREATININA	1,86	mg/Dl	0,243
GLUCOSA	99,3	mg/Dl	0,302
COLESTEROL	198	mg/dL	0,447
TRIGLICÉRIDOS	114	mg/Dl	0,105
UREA/BUN	37,3	mg/dL	0,616
PROTEÍNA TOTAL	8,3	g/L	0,061

Tabla 25. CONCENTRACIONES Y ABSORBANCIAS CORRESPONDIENTES A LOS ANALITOS EN LA MUESTRA

7.3.3.1 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA ALT/GPT.

PATRON	CONCENTRACION (U/L)	ABSORBANCIA (A)
S. control	32,5	0,352
S. calibrador	105	1,056
Muestra	50,3	0,538

Tabla 26. DATOS PARA CONSTRUIR LA CURVA DE CALIBRACION DE ALT/GPT.

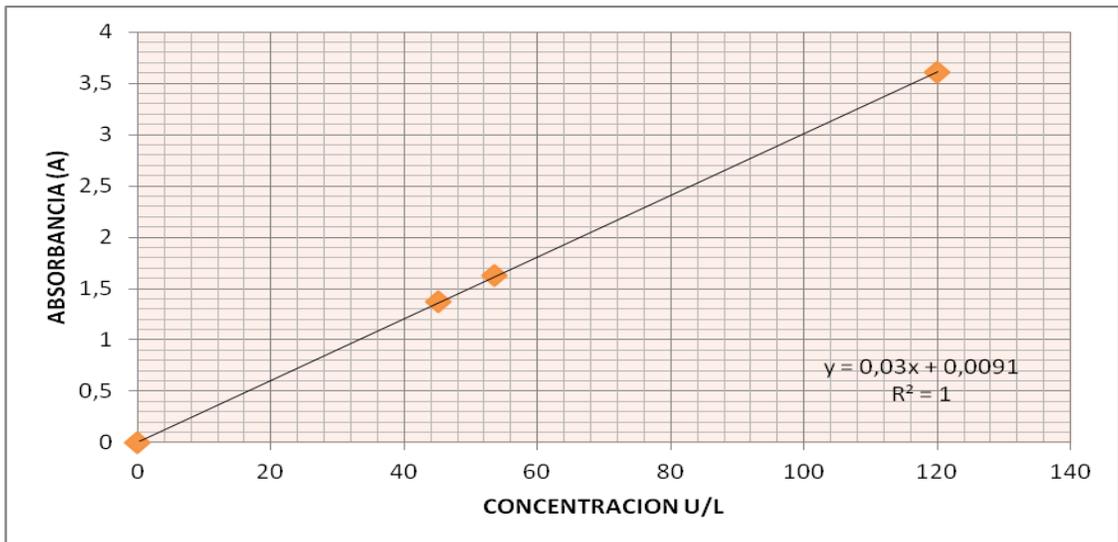


Gráfica 3. CURVA DE CALIBRACION PARA ALT/GPT.

7.3.3.2 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA AST/GOT.

PATRON	CONCENTRACION (U/L)	ABSORBANCIA (A)
S. control	45,2	1,372
S. calibrador	120	3,603
Muestra	53,6	1,626

Tabla 27. DATOS PARA CONSTRUIR LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE AST/GOT.

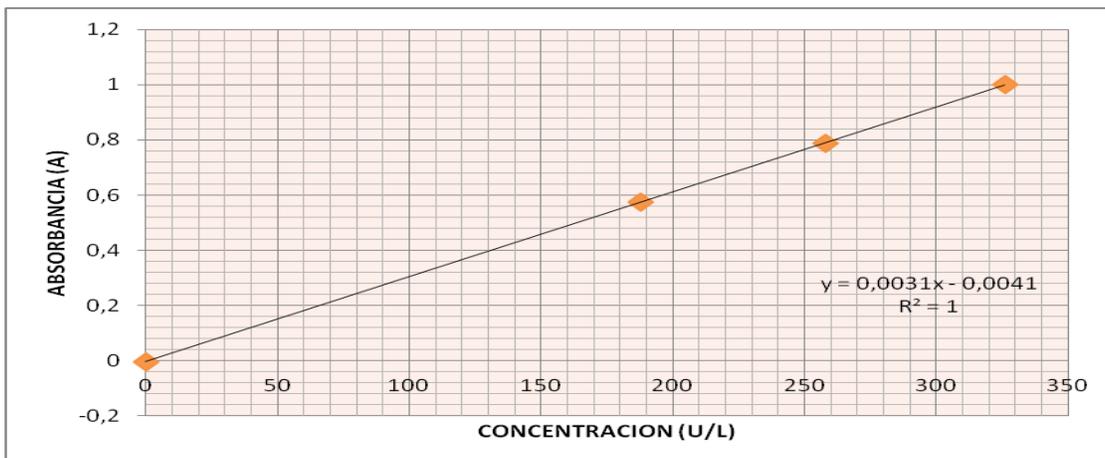


Gráfica 4. CURVA DE CALIBRACION PARA AST/GOT.

7.3.3.3 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA CK.

PATRON	CONCENTRACION (U/L)	ABSORBANCIA (A)
S. control	188	0,576
S. calibrador	326	1,001
Muestra	258	0,788

Tabla 28. DATOS PARA CONSTRUIR LA CURVA DE CALIBRACION DE CK.

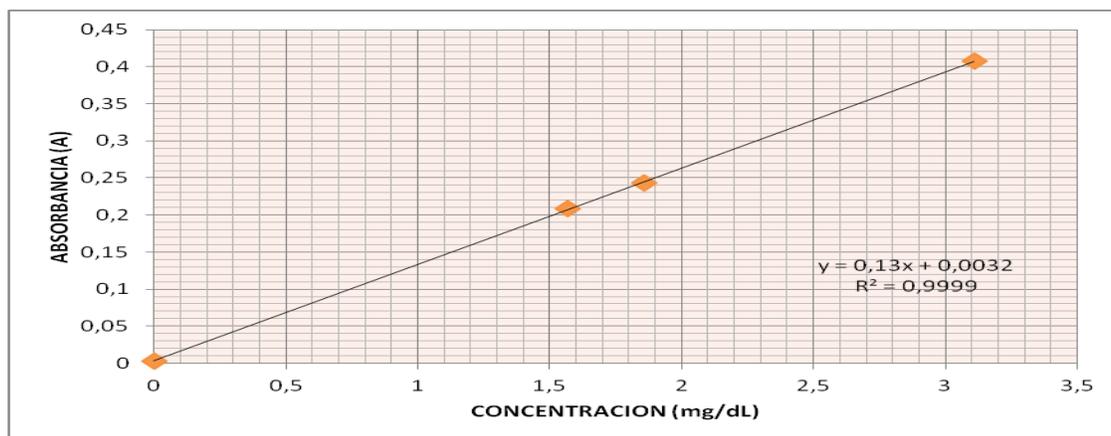


Gráfica 5. CURVA DE CALIBRACION PARA CK.

7.3.3.4 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA CREATININA.

PATRON	CONCENTRACION (mg/dL)	ABSORBANCIA (A)
S. control	1,57	0,209
S. calibrador	3,11	0,408
Muestra	1,86	0,243

Tabla 29. DATOS PARA CONSTRUIR LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE CREATININA.

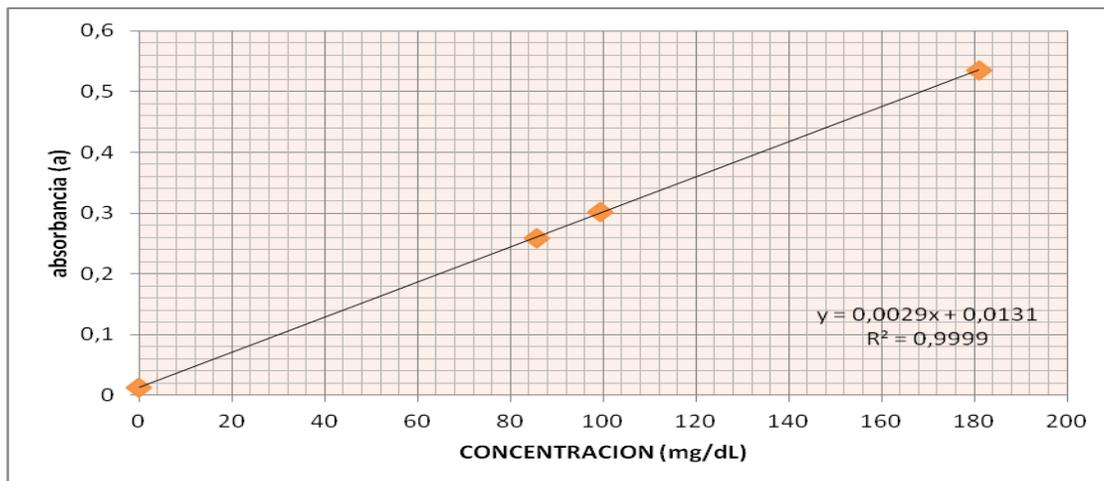


Gráfica 6. CURVA DE CALIBRACION PARA CREATININA.

7.3.3.5 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA GLUCOSA.

PATRON	CONCENTRACION (mg/dL)	ABSORBANCIA (A)
S. control	85,6	0,258
S. calibrador	181	0,535
Muestra	99,3	0,302

Tabla 30. DATOS PARA CONSTRUIR LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE GLUCOSA.

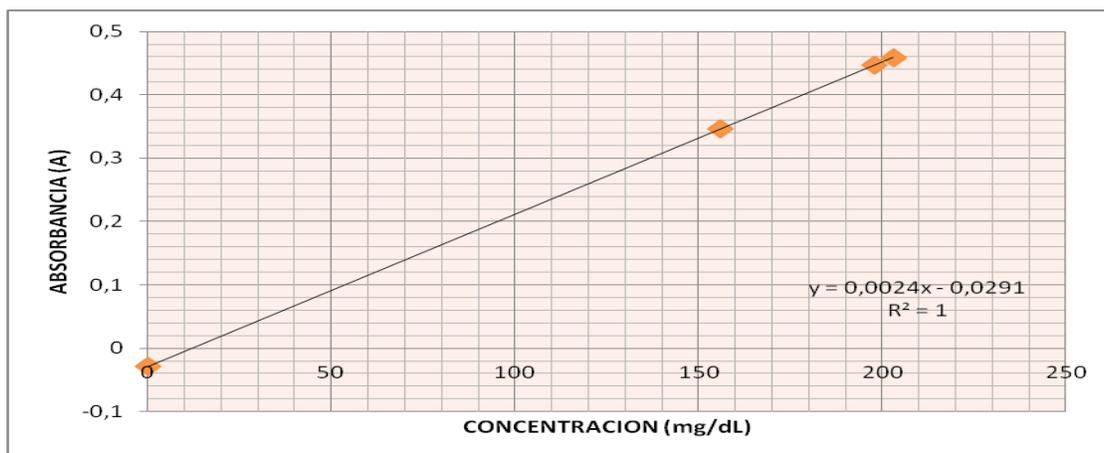


Gráfica 7. CURVA DE CALIBRACION PARA GLUCOSA.

7.3.3.6 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA COLESTEROL.

PATRON	CONCENTRACION (mg/dL)	ABSORBANCIA (A)
S. control	156	0,346
S. calibrador	203	0,459
Muestra	198	0,447

Tabla 31. DATOS PARA CONSTRUIR LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE COLESTEROL.

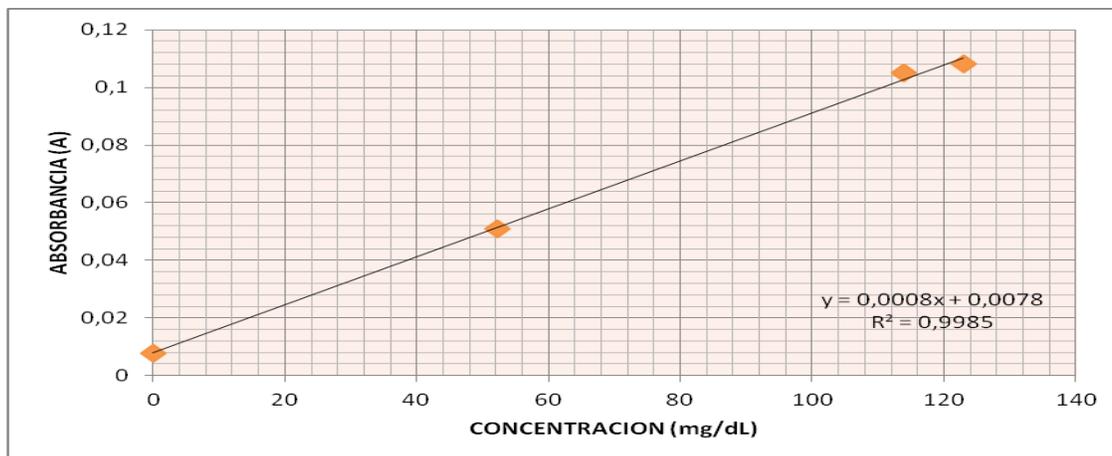


Gráfica 8. CURVA DE CALIBRACION PARA COLESTEROL.

7.3.3.7 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA TRIGLICÉRIDOS.

PATRON	CONCENTRACION (mg/dL)	ABSORBANCIA (A)
S. control	52,3	0,051
S. calibrador	123	0,108
Muestra	114	0,105

Tabla 32. DATOS PARA CONSTRUIR LA CURVA DE CALIBRACION DE TRIGLICÉRIDOS.



Gráfica 9. CURVA DE CALIBRACION PARA TRIGLICÉRIDOS.

Dada la dispersión de los puntos respecto a la línea de tendencia, se procede a realizar un ajuste por el método de mínimos cuadrados o regresión lineal para corregir tal dispersión. El fundamento del método se encuentra consignado en el Anexo A.

x (mg/dL)	y (A)	x*y	x ²
0	0,0078	0	0
52,3	0,051	2,6673	2735,29
114	0,105	11,97	12996
123	0,108	13,284	15129
SUMATORIAS	289,3	27,9213	30860,29

Tabla 33. DATOS PARA REALIZAR LA REGRESIÓN LINEAL EN LA CURVA DE CALIBRACION DE TRIGLICÉRIDOS.

Ahora, se hallan los términos matemáticos **a** y **b**, mediante las formulas descritas a continuación:

$$a = \frac{\sum x_i \sum y_i - n \sum x_i y_i}{(\sum x_i)^2 - n \sum x_i^2}$$

$$b = \frac{\sum x_i y_i \sum x_i - \sum y_i \sum x_i^2}{(\sum x_i)^2 - n \sum x_i^2}$$

Siendo $n=3$ (número de datos) se obtienen los siguientes valores para a y b , correspondientes a la ecuación para la recta de la curva de calibración para triglicéridos:

$$a = 0,0008316$$

$$b = 0,00780429$$

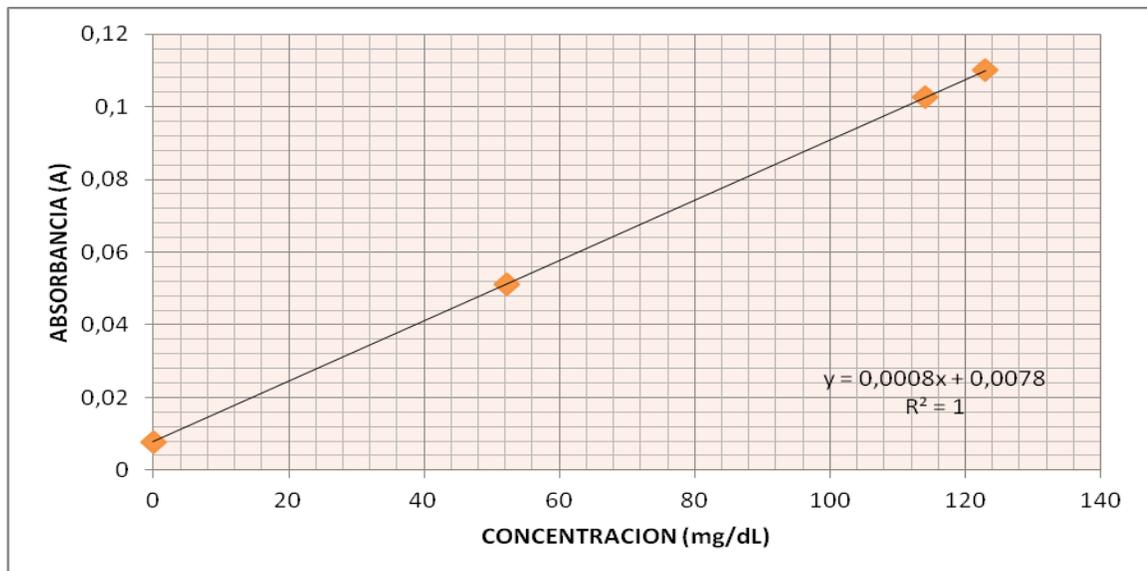
Al ser la gráfica una recta, la ecuación correspondiente es de la forma $y = ax + b$; por tanto:

$$y = 0,0008316x + 0,00780429$$

Reemplazando los valores de la variable x (CONCENTRACION) consignados en la **TABLA 32**, se obtienen los siguientes datos para construir la curva de calibración:

PATRON	CONCENTRACION (mg/dL)	ABSORBANCIA (A)
Blanco	0	0,00780429
S. control	52,3	0,05129714
S. calibrador	123	0,11009149
Muestra	114	0,10260707

Tabla 34. DATOS PARA CONSTRUIR LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS OBTENIDOS MEDIANTE AJUSTE POR EL MÉTODO DE MÍNIMOS CUADRADOS.

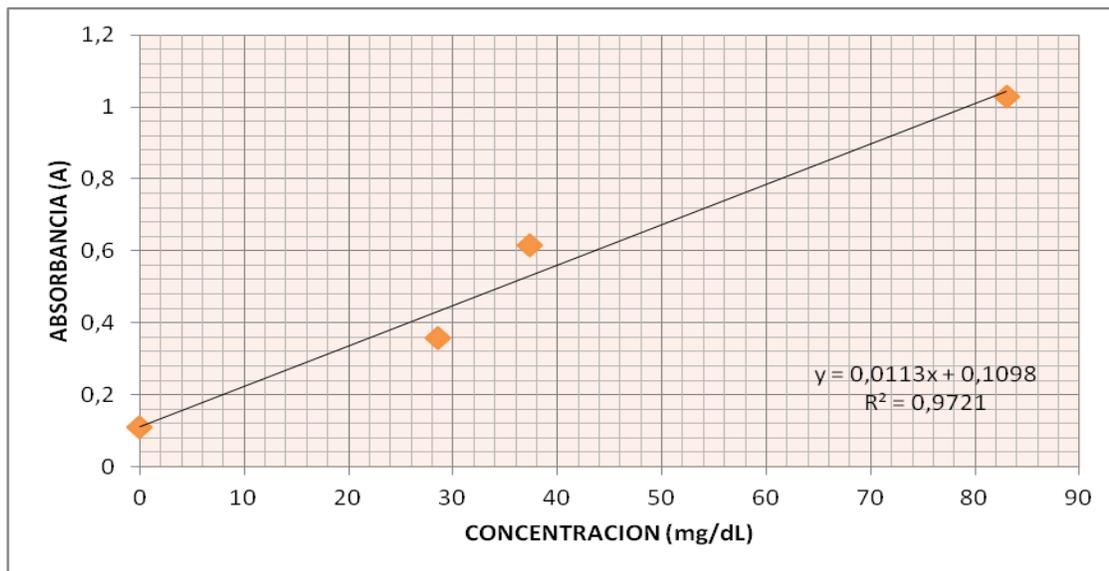


Gráfica 10. CURVA DE CALIBRACION PARA TRIGLICÉRIDOS OBTENIDA MEDIANTE AJUSTE POR EL MÉTODO DE MÍNIMOS CUADRADOS.

7.3.3.8 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA UREA/BUN.

PATRON	CONCENTRACION (mg/dL)	ABSORBANCIA (A)
S. control	28,6	0,359
S. calibrador	83	1,030
Muestra	37,3	0,616

Tabla 35. DATOS PARA CONSTRUIR LA CURVA DE CALIBRACION DE UREA/BUN.



Gráfica 11. CURVA DE CALIBRACION PARA UREA/BUN.

Dada la dispersión de los puntos respecto a la línea de tendencia, se procede a realizar un ajuste por el método de mínimos cuadrados.

	x (mg/dL)	y (A)	x*y	x ²
	0	0,1098	0	0
	28,6	0,359	10,2674	817,96
	37,3	0,616	22,9768	1391,29
	83	1,03	85,49	6889
SUMATORIAS	148,9	2,1148	118,7342	9098,25

Tabla 36. DATOS PARA REALIZAR LA REGRESIÓN LINEAL PARA LA CURVA DE CALIBRACION DE UREA/BUN.

Ahora, se procede a determinar los valores a y b mediante el uso de las ecuaciones 4 y 5 del numeral 6.3.7

Siendo $n = 4$ (numero de datos) y empleando los datos consignados en la TABLA 33, se obtiene:

$$a = 0,01125337$$

$$b = 0,10979326$$

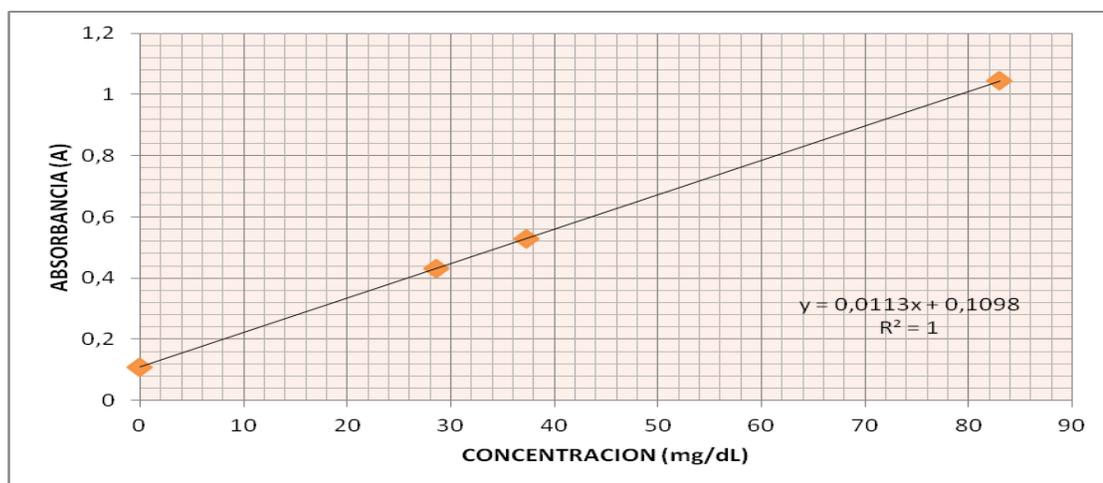
Por tanto,

$$y = 0,01125337x + 0,10979326$$

Reemplazando los valores de x (CONCENTRACION) de la TABLA 32, se obtiene:

PATRON	CONCENTRACION (mg/dL)	ABSORBANCIA (A)
Blanco	0	0,10979326
S. control	28,6	0,43163967
S. calibrador	83	1,04382306
Muestra	37,3	0,529544

Tabla 37. DATOS PARA CONSTRUIR LA CURVA DE CALIBRACION DE UREA/BUN OBTENIDOS MEDIANTE AJUSTE POR EL MÉTODO DE MÍNIMOS CUADRADOS.

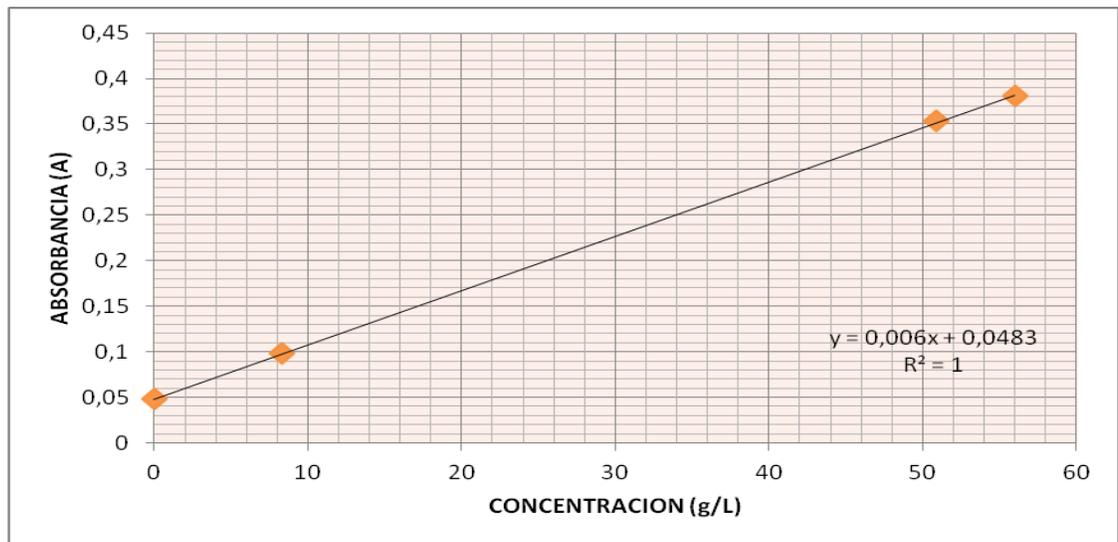


Gráfica 12. CURVA DE CALIBRACION PARA UREA/BUN OBTENIDA MEDIANTE AJUSTE POR EL MÉTODO DE MÍNIMOS CUADRADOS.

7.3.3.9 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA PROTEÍNA TOTAL.

PATRON	CONCENTRACION (g/L)	ABSORBANCIA (A)
S. control	50,9	0,353
S. calibrador	56	0,381
Muestra	8,3	0,061

Tabla 38. DATOS PARA CONSTRUIR LA CURVA DE CALIBRACION DE PROTEÍNA TOTAL.



Gráfica 13. CURVA DE CALIBRACION PARA PROTEINA TOTAL.

Retomando la información del apartado 5.4.3 sobre sensibilidad de calibración, se determina esta, partiendo de la ecuación:

$$S = mc + S_{bl}$$

Siendo:

S= Señal medida.

c= Concentración del analito.

S_{bl} = Señal instrumental del blanco.

m= Pendiente de la línea recta.

De esta manera el valor de la pendiente m indica la sensibilidad, es decir, un valor alto de m , significa una alta sensibilidad y un valor bajo de m , una baja sensibilidad. ¹⁴. En la **TABLA 38** se consignan los correspondientes valores de sensibilidad determinados para cada uno de los métodos de medición:

ANALITO	SENSIBILIDAD
ALT/GPT	0,0097
AST/GOT	0,003
CK	0,0031
CREATININA	0,13
GLUCOSA	0,0029
COLESTEROL	0,0024
TRIGLICÉRIDOS	0,0008
UREA/BUN	0,0113
PROTEÍNA TOTAL	0,006

Tabla 39. SENSIBILIDAD DE CALIBRACION PARA CADA UNO DE LOS MÉTODOS DE MEDICIÓN.

7.3.4 LÍMITES DE DETECCIÓN Y DE CUANTIFICACIÓN.

Con base en la información consignada en el apartado 5.4.4 para límite de detección y límite de cuantificación, descrita mediante las ecuaciones:

$$\text{Límite de detección (LD)} = y_B + 3 s_B$$

$$\text{Límite de cuantificación (LQ)} = y_B + 10s_B$$

Se procede a determinar el límite de detección y el de cuantificación para cada uno de los métodos de medición objeto de estudio; siendo:

y_B = Señal del blanco.

s_B = Desviación estándar del blanco.

Para este fin, se toma una población de datos obtenidos en las diferentes mediciones realizadas para la señal del blanco; los resultados, en términos de absorbancia (A) se establecen a continuación:

ANALITO	SEÑAL DEL BLANCO			MEDIA (m)	DESVIACION ESTANDAR (s)	LIMITE DE DETECCION (L.D)	LIMITE DE CUANTIFICACIÓN (L.C)
ALT/GPT	0,0513	0,0443	0,0483	0,04796667	0,003511885	0,05850232	0,083085513
AST/GOT	0,0131	0,0091	0,0151	0,01243333	0,00305505	0,021598485	0,042983838
CK	0,0101	0,0041	0,0125	0,0089	0,004326662	0,021879985	0,052166615
CREATININA	0,0096	0,0032	0,0105	0,00776667	0,003980368	0,019707772	0,047570352
GLUCOSA	0,0206	0,0131	0,0165	0,01673333	0,00375544	0,027999655	0,054287738
COLESTEROL	0,0587	0,0291	0,0783	0,05536667	0,024768798	0,129673059	0,303054642
TRIGLICÉRIDOS	0,0099	0,0078	0,0138	0,0105	0,003044667	0,019634002	0,040946675
UREA/BUN	0,0893	0,1098	0,1113	0,10346667	0,012291596	0,140341455	0,226382627
PROTEÍNA TOTAL	0,1126	0,0483	0,0952	0,08536667	0,033258733	0,185142866	0,417953999

Tabla 40. LÍMITES DE DETECCION Y CUANTIFICACION PARA CADA UNO DE LOS MÉTODOS DE MEDICIÓN.

8 CONCLUSIONES.

Con el desarrollo de este trabajo, el Centro Integral de Diagnostico Agropecuario de Risaralda-CIDAR tiene implementada y documentada una metodología de análisis para nueve (9) componentes de Química Sanguínea, a saber: ALT/GPT, AST/GOT, CK, creatinina, colesterol, glucosa, triglicéridos, urea/BUN y proteína total. Esta implementación es un paso importante para garantizar la calidad de los análisis, pues garantiza que las mediciones siempre se realicen de igual forma.

Los resultados obtenidos de la implementación, permitieron determinar las condiciones experimentales adecuadas para el correcto funcionamiento de los métodos de análisis. Esto se logró, adecuando los métodos básicos proporcionados por el proveedor a las condiciones del laboratorio. Con estas condiciones resultantes, se realizarán los análisis de cada componente.

Los resultados obtenidos para los parámetros de calidad analítica de cada uno de los métodos implementados, avalan la calidad en las mediciones que se realizarán siguiendo la metodología implementada.

La metodología implementada se encuentra documentada en el Manual de Operación correspondiente a Química Sanguínea, haciendo así, una contribución experimental a los diagnósticos clínicos veterinarios, facilitando el manejo del equipo, el desarrollo de los métodos y la emisión de los resultados por parte del Centro Integral de Diagnóstico Agropecuario (CIDAR).

9 BIBLIOGRAFÍA.

- [1] Elizabeth Villiers, Laura Blackwood. (2012). Manual de Diagnóstico de Laboratorio en Pequeños Animales. España: Grafos S.A.
- [2] Wildeman Zapata Builes, Holtman Deiver Fajardo Rincón. Manual de Química Sanguínea Veterinaria. De Laboratorio Microclin S.R.L Sitio web: http://www.microclin.com/archivos/manual_de_quimica_sanguinea_veterinaria_Zapata_Fajardo.pdf
- [3] Ministerio de Salud y protección social (2014). Lineamiento para IVC de establecimientos veterinarios y afines Santa Fe de Bogotá D.C:
- [4] Dr. Salvador Giménez. (2000). Bioquímica Sanguínea. 2000, de Medicina 21 Sitio web: <http://www.medicina21.com/doc.php?apartat=Tecnicas&id=1182>
- [5] Eduardo Luis Cedeño Montanero. (2000). Manual Práctico de Laboratorio Clínico. Ecuador: Medicina 4A.
- [6] John W. Baynes, Marek H. Dominiczak. (2011). Bioquímica Médica. España: Elsevier.
- [7] Gustavo Sánchez Visconti. (Enero-Febrero de 2009). Función Hepática y Parámetros Analíticos. Centro Veterinario, Volumen 31, 4-5.
- [8] Santiago Gómez Ruiz, María Isabel Sierra Alonso, Damián Pérez Quintanilla. (2010). Análisis Instrumental. España: Netbiblio.
- [9] Lucas Hernández Hernández, Claudio González Pérez. (2002). Introducción al análisis instrumental. España: Editorial Ariel.
- [10] Federman Castro Eusse. (2011). Análisis Instrumental. Colombia: Publicaciones UTP.
- [11] F,X Riux. (2000). La Validación de Métodos Analíticos. Técnicas de Laboratorio, 252, 382-385.
- [12] Carlos Mongay Fernández. (2005). Quimiometría. España: Juli Capilla.
- [13] James N. Miller, Jane C. Miller. (2002). Estadística y Quimiometría para Química Analítica. Madrid: Prentice Hall.

[14] Carlos Rodríguez P., Héctor Gómez R., Scila Réategui S.. (2002). Estudio de la Sensibilidad Espectrofotométrica del Cromo (III) y del Cromo (IV). Revista Peruana de Química e Ingeniería Química, Volumen 5 N°1, 29-36.

ANEXO A.

MÉTODO DE AJUSTE POR MÍNIMOS CUADRADOS.

Cuando se grafican variables sobre un plano, los lugares geométricos o puntos experimentales en muchas oportunidades no dejan muy claro, que al unirlos reproduzcan una línea recta única, sino que muchas rectas perfectamente podrían ser representativas de los puntos dibujados; razón por la cual surge obligadamente la pregunta ¿Cuál es la recta correcta?, en consecuencia se explorará a continuación un método analítico, para atender la inquietud planteada.

El procedimiento en cuestión toma como base el principio estadístico de los mínimos cuadrados y considera este en una aplicación restringida para encontrar una línea recta que se ajuste a los valores medidos. *Se supone un conjunto de “n” valores de una variable V_d , medidos como función de la variable V_i , se restringe al caso especial de que toda la incertidumbre se limita a la dimensión V_d : esto es, los valores de V_i se conocen exactamente, o al menos, con una precisión tanto mayor que la de los valores de V_d , para poder despreciar la incertidumbre en la dimensión V_i .* Si no se satisface esta condición, el tratamiento sencillo que se explica a continuación no será válido y el método requerido está fuera de este contexto.

Nuevamente la pregunta a satisfacer ahora con éste procedimiento matemático es: ¿Cuál de todas las líneas en el plano $V_d - V_i$ se escoge como la mejor, con qué criterio y qué significa definir “la mejor recta”? El principio de mínimos cuadrados permite hacer esta escogencia sobre el principio de las desviaciones de los puntos en dirección vertical a partir de las posibles líneas. Sea la Línea Recta LR en la figura 5 un prospecto con la categoría de la “mejor línea recta”. Obsérvese los diferentes intervalos verticales entre los puntos experimentales y la recta escogida de los cuales $C_2 H_2$ es típico. *Se define como mejor recta aquella que minimiza la suma de los cuadrados de las desviaciones $C_2 H_2$.*

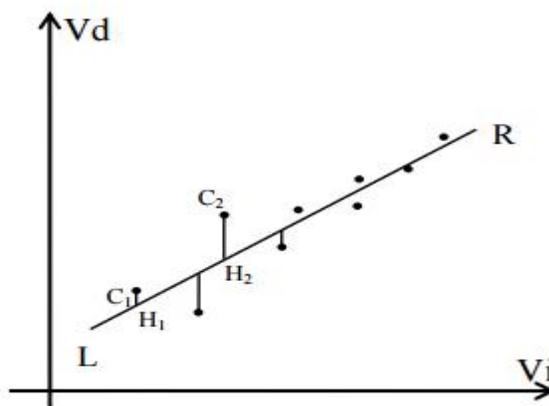


Figura 5 Ajuste de una línea recta a un conjunto de puntos por el principio de mínimos cuadrados.

Se expresa el principio de mínimos cuadrados en forma matemática al definir que la mejor línea se corresponde con aquella que minimiza o lleva a su valor mínimo la suma del cuadrado de las desviaciones verticales,

$$\text{Desviación } \Sigma(C_2 H_2)^2$$

Además se debe calcular los parámetros: pendiente a y la ordenada al origen b , de esa mejor línea; considérese como la ecuación de la mejor línea recta:

$$Vd = a Vi + b$$

La magnitud de la desviación $C_i H_i$ es el intervalo entre un cierto valor medido Vd_i , y el valor de Vd en ese punto, para el valor de Vd . Este valor Vd se puede calcular a partir del valor correspondiente de Vi como $a Vi + b$, de modo que, si se llama δVi a cada diferencia, se tiene,

$$\delta Vd_i = Vd_i - (a Vi + b)$$

El criterio de mínimos cuadrados permite calcular los valores deseados de a y b a partir de la condición,

$$\Sigma[Vd_i - a Vi + b]^2 = \text{Mínimo}$$

Aplicando la condición para que sea un mínimo:

$$\frac{\partial \text{Min}}{\partial a} = 0 \quad \text{y} \quad \frac{\partial \text{Min}}{\partial b} = 0$$

Un breve ejercicio algebraico permite obtener la pendiente y la ordenada al origen de la mejor recta, para ello el cuadro siguiente facilita el cálculo de las operaciones indicadas sobre las variables, en las dos columnas de la derecha. Las sumas en cada columna, visualizadas en las celdas inferiores de la tabla son reemplazadas en las siguientes ecuaciones:

Medida N _o	Vd _i Eje vertical	Vi _i Eje horizontal	(Vi _i) ²	Vi _i • Vd _i
1				
2				
3				
4				
5				
6				
⋮				
.				
n =	Σ Vd _i =	Σ Vi _i =	Σ (Vi _i) ² =	Σ (Vi _i • Vd _i) =

Tabla 2 Cuadro genérico para procesar datos provenientes de un experimento, que se emplean en una **regresión lineal**.

$$a = \frac{n \sum Vi_i (udm) \bullet Vd_i (udm) - \sum Vi_i (udm) \sum Vd_i (udm)}{n \sum (Vi_i (udm))^2 - (\sum Vi_i (udm))^2}$$

$$b = \frac{\sum Vd_i (udm) \sum (Vi_i (udm))^2 - \sum Vi_i (udm) \sum Vi_i (udm) \bullet Vd_i (udm)}{n \sum (Vi_i (udm))^2 - (\sum Vi_i (udm))^2} \quad (1)$$

Donde:

Vi_i (udm) Y Vd_i (udm): Son los diferentes valores experimentales de las variables.

(udm): Representa las unidades de medida de cada variable.

Éste método contiene significado estadístico que permite una forma próxima para el cálculo de la incertidumbre. El principio de mínimos cuadrados facilita inmediatamente valores de la desviación estándar de la pendiente y la ordenada al origen, lo que proporciona incertidumbres con significado estadístico conocido.