

7. METODOLOGÍA

1. Pacientes.

Se utilizarán **cinco** pacientes, de los que acuden al Área de Extracciones del propio Laboratorio, con objeto de que dichas muestras sean rápidamente procesadas.

Dichos pacientes se elegirán al azar, excluyendo del estudio a aquellos que presenten signos de especial gravedad, venas con dificultades para la extracción, niños o ancianos, que los sueros estén fuertemente hemolizados o hiperlipémicos, y cualquier otra circunstancia que el facultativo considere que desaconseja participar en el estudio.

A cada paciente se le explicará verbalmente y de forma simple y clara, que se le pide su autorización para obtener un poco más de su sangre, con objeto estudiar las mejores condiciones para mantener las muestras de sangre hasta que se analicen. Es un **imperativo legal** obtener este **consentimiento informado** en cada paciente. Pero no tiene que ser ni extenso, ni por escrito, ni firmado. Sólo verbal, claro, y ante algún testigo (por ejemplo, el ATS que realiza la extracción).

2. Muestras.

Se tomará a cada paciente, además de los tubos que necesite para el estudio solicitado, **tres** tubos de 10 ml sin ningún conservante ni gel separador. Se marcarán de forma adecuada para que puedan ser reconocidos, y luego identificar las alícuotas de cada paciente.

3. Centrifugación.

Se dejarán a temperatura ambiente un tiempo no inferior a 15 minutos y no superior a 30 minutos. Trascendido este tiempo, se centrifugan a **1.500 x g**, durante **diez** minutos, sin refrigerar la centrífuga.

Para el cálculo del valor **g** de la centrífuga, es necesario medir el radio de giro. El radio de giro se mide en cm. desde el centro del eje de giro hasta la posición que ocuparía el extremo del fondo del tubo cuando se encuentra en máximo giro, y que generalmente ocurre cuando está en posición horizontal (rotor basculante).

La fórmula a aplicar es:

$$g = 1,118 \times 10^{-5} \times r \times n^2$$

donde:

g es la fuerza centrífuga relativa

r es el radio de giro del tubo en la centrífuga

n es el número de revoluciones por minuto a que se ha ajustado.

Nótese que la fuerza centrífuga relativa es directamente proporcional al radio de giro, y proporcional al **cuadrado** de la velocidad.

4. **Alicuotado.**

Tras centrifugar, extraer alícuotas del suero de cada paciente en la forma siguiente:

Día a analizar la muestra alícuota:

Temperatura	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Lunes
Ambiente (20°C)	t ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄	t ₅
Nevera (4°C)		t ₁	t ₂	t ₃	t ₄	t ₅
37° C		t ₁	t ₂	t ₃	t ₄	t ₅
Congelador (-20°)		t ₁	t ₂	t ₃	t ₄	t ₅

Es decir, de cada paciente se obtendrán **21 alícuotas** de suero. La cantidad de suero en cada alícuota debe ser suficiente para realizar todos los análisis de esta Fase, teniendo en cuenta que los analizadores suelen requerir un volumen extra de muestra al que se denomina “volumen muerto”.

De esta forma se obtiene además una muestra alícuota que se analiza el mismo día de la extracción (muestra del primer lunes), y con la mayor brevedad posible. El intervalo total entre la extracción y el análisis no debe ser superior a una hora, incluyendo el tiempo empleado en la retracción del coágulo, la centrifugación y el alicuotado. Esta muestra no se somete a stress térmico ni de tiempo. Es decir, se analiza cuanto antes sea posible.

Esta medición es la que proporciona los valores originales de la muestra de ese paciente, y se considera “**tiempo 0**” (t₀). Los resultados de las otras alícuotas, sometidas a stress de temperatura (T₋₂₀, T₊₄, T₊₂₀ y T₊₃₇) y de tiempo (t₁ a t₅) mostrarán la desviación (aumento o disminución) de este valor inicial.

5. **Temperaturas.**

Protocolo de temperaturas.

Las alícuotas se someterán a **cuatro temperaturas** distintas (T₋₂₀, T₊₄, T₊₂₀ y T₊₃₇), durante periodos diferentes. Así, de cada paciente, cinco alícuotas permanecerán a temperatura ambiente, otras cinco se guardarán en nevera a 4 a 8 °C, otras cinco se congelarán a unos 20°C bajo cero, y otras cinco se someterán a una temperatura de 37°C.

En los días señalados (por ejemplo, martes a viernes y lunes siguiente, si la extracción se realizó un lunes), se tomará una alícuota del paciente, sometida a cada una de las temperaturas (cuatro), y se analizarán en las condiciones habituales. Es decir, por paciente se analizarán **cuatro** alícuotas **por día**, y en total, **veinte** alícuotas por día.

De esta forma, las alícuotas de cada nivel de temperatura salen del baño, de la nevera, del congelador, o de la estufa de cultivos, a las 24, 48, 72, 96, 120 y 168 horas, o lo que es lo mismo, a día siguiente, a los dos, tres, cuatro, cinco y siete días (t_1 a t_5).

Es necesario “estabilizar” todas esas alícuotas a analizar cada día, permitiendo que se descongelen o se atemperen a la misma temperatura ambiente. Una forma adecuada de hacerlo es sumergir los tubos en un recipiente con agua del grifo durante unos minutos. Es importante homogeneizar los sueros descongelados mediante varias inversiones del tubo, pues tienden a estratificarse (8). Este efecto se puede observar a simple vista: la parte superior es más clara y las proteínas están en la parte baja del tubo, al descongelar suero.

Equipos para mantenimiento de las temperaturas:

- a) **Temperatura ambiente (T_{+20}):** Para conservar las muestras a temperatura ambiente, lo adecuado es usar un baño maría termostatzado, ajustado a 20°C. Si no se dispone de un baño, o se usa el único que hay, sólo para las muestras a 37°C, es suficiente el sumergir los tubos, perfectamente cerrados, en un volumen de agua del grifo, no inferior a 1 litro. El agua tiene una gran inercia térmica, y mantendrá la temperatura bastante constante a lo largo del estudio, independientemente de las oscilaciones de la temperatura del aire de la habitación. El nivel del agua del recipiente debe **cubrir** el nivel alcanzado por el suero dentro del tubo. Es, lógicamente, imprescindible medir esa temperatura y registrarla.
- b) **Nevera (T_{+4}):** se usará una nevera tipo doméstico o una cámara frigorífica, en la que se alcance una temperatura cercana a los 4°C, y no superior a los 10°C. También es conveniente, para evitar oscilaciones de temperatura a lo largo del estudio, el sumergir los tubos en un recipiente con agua que haya permanecido al menos 24 horas antes en la nevera, para que alcance la temperatura adecuada. No se debe olvidar que la temperatura del aire en una nevera o en una cámara frigorífica varía de forma notable según la zona en se mida (las zonas bajas suelen ser más frías), y de la frecuencia con que se abre la puerta. Por eso se recomienda sumergir los tubos en un recipiente con agua, y medir la temperatura de ésta.
- c) **Treinta y siete grados C (T_{+37}):** Lo ideal es usar un baño maría con agitación del agua, y con mecanismo de regulación termostatzado. No debe olvidarse que el agua se evapora a lo largo de los días, y se debe vigilar su nivel.

Si no se dispone de un baño maría termostatzado, una solución factible es la de mantener las alícuotas en una estufa de cultivos como las que se usan en Microbiología, termostatzada a 37°C,.

Será necesario asegurarse en cualquiera en los dos casos, que los tubos permanecen herméticamente cerrados durante el periodo de estudio, para evitar evaporaciones del suero.

- d) **Congelador:** se usará un congelador de calidad (los pequeños congeladores que se encuentran en la parte superior de las neveras tipo doméstico de una sola puerta, difícilmente alcanzan los veinte grados bajo cero recomendados para este estudio). Para homogeneizar la temperatura (y facilitar su medición), se pueden sumergir los tubos en algún recipiente que contenga alcohol previamente enfriado. Será necesario asegurarse que ni el alcohol ni la congelación alteran el marcado o etiquetado de los tubos, y que luego sea imposible identificarlos.

Medición de las temperaturas reales alcanzadas:

Es necesario medir las temperaturas a las que realmente se han sometido las muestras, pues el cálculo posterior estará basado en las diferencias de la **velocidad de degradación** de la magnitud bioquímica a estudiar, que está directamente relacionada con la temperatura (stress térmico).

Por ello habrá que determinar la temperatura a que se ha sometido cada uno de los grupos de muestras. Se suministrará por parte de SANAC a cada Laboratorio participante un termómetro digital con sonda metálica, de amplio rango de medida (al menos entre -40°C y +100°C).

En el caso de que se use un recipiente con agua o con alcohol, donde se han puesto los tubos, bastará sumergir la sonda metálica durante unos 15 minutos, cada mañana, con la puerta de la nevera o el congelador cerradas, y **registrar** la temperatura para ese sistema y ese día. Si los tubos no están sumergidos, será necesario colocar al principio del estudio un recipiente adicional con agua (o alcohol en el congelador), para introducir la sonda y medir la temperatura cada día, ya que la sonda no debe tocar las paredes de la nevera o congelador, ni medir la temperatura del aire.

En una primera Fase 0, se deberá medir la constancia de las temperaturas alcanzadas a lo largo de varios días (por ejemplo, un a semana). Puede ser incluso conveniente medir las temperaturas varias veces a lo largo del día, ya que el uso frecuente de las neveras o congeladores por las mañanas puede hacer que varíen.

Si las temperaturas medidas a lo largo del estudio son bastante homogéneas dentro de cada nivel, se calculará la media de cada nivel, y se anotará en la Hoja Excel de resultados.

Si son claramente diferentes de un día a otro, y se descarta un error en la medida, será necesario revisar los sistemas de mantenimiento de temperatura (resistencias, termostatos, repetida apertura de puertas, nivel de gas refrigerante, manipulación errónea, etc.) y repetir el estudio cuando las variables estén controladas.

Una vez asegurada la constancia de las temperaturas, se comienza la Fase 1 con las muestras de suero. Pero será necesario seguir registrando las temperaturas (aunque ahora puede ser suficiente una sola lectura al día), para comprobar que no aparece un cambio inesperado.

6. Tiempos.

Las alícuotas enfriadas o calentadas permanecerán en sus niveles de temperatura durante diferentes intervalos de tiempo. De esta forma se podrá calcular la **velocidad de degradación**.

Un protocolo bastante cómodo y lógico será el de extraer las muestras de sangre de los cinco pacientes un lunes. A continuación dejar que coagulen y se retraigan los coágulos, centrifugar, y dividir en los correspondientes alícuotas en tubos secundarios previamente identificados.

Un alícuota se somete inmediatamente a análisis de todas las magnitudes a estudiar: es la muestra a "tiempo cero". Y el resto de alícuotas se coloca a las cuatro temperaturas descritas.

El día siguiente, martes (t_1), se recupera **un alícuota** por temperatura y paciente. Son **veinte** alícuotas (cuatro temperaturas por cinco pacientes). Se atemperan y se analizan simultáneamente en un solo lote en el equipo, junto con el suero control específico.

Lo mismo se hace el miércoles (t_2), jueves (t_3), viernes (t_4), y lunes (t_5) siguientes.

Alícuotas de paciente a analizar por día y temperatura:

Temperatura	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Lunes
Ambiente (20°C)	Alic. de 5 pac.	Alic. de 5 pac.	Alic. de 5 pacientes	Alic. de 5 pac.	Alic. de 5 pac.	Alic. de 5 pac.
Nevera (4°C)		Alic. de 5 pac.	Alic. de 5 pacientes	Alic. de 5 pac.	Alic. de 5 pac.	Alic. de 5 pac.

37° C		Alic. de 5 pac.	Alic. de 5 pacientes	Alic. de 5 pac.	Alic. de 5 pac.	Alic. de 5 pac.
Congelador (-20°)		Alic. de 5 pac.	Alic. de 5 pacientes	Alic. de 5 pac.	Alic. de 5 pac.	Alic. de 5 pac.

De esta forma podemos estudiar cambios de estabilidad que aparezcan pronto o que se retrasen, y cómo afecta la temperatura. Y todo a la vez y con el mismo tratamiento matemático.

7. Equipos de análisis y uso de controles.

El objetivo del estudio es el de determinar, para cada Laboratorio, las condiciones óptimas, o al menos las aceptables, en que deben estar sus muestras, para que los resultados de los análisis no sean falseados.

Por lo tanto, cuantas más magnitudes bioquímicas se puedan estudiar, será mejor para ese Laboratorio.

Sin embargo, dado que los resultados de todos los Laboratorios participantes se mezclarán para realizar los cálculos (salvo que un análisis estadístico muestre que una magnitud de algún Laboratorio no debe ser incluida en el conjunto), es conveniente que las magnitudes a estudiar sean lo más comunes posibles.

Es decir, cada Laboratorio, aun en el caso de que sus resultados no se pudieran mezclar con los del resto, obtendrá el beneficio de poder predecir cuáles son la temperatura y el tiempo adecuados para mantener estables **sus propias muestras**, medidas **en su propio equipo**. Y debe incluir cuantas más magnitudes mejor: quizás todas las que mide habitualmente en su equipo de "bioquímica general del suero".

Pero además, la participación de muchos Laboratorios hará que los resultados **globales** sean mucho más fiables. Y serán trasladables a cualquier Laboratorio que use el mismo método de medición, aunque no haya participado en este estudio.

Se incluyen en la Hoja de Cálculo las magnitudes que solicita el Control de Calidad Externo de la SEQC para la bioquímica del suero, y en el mismo orden.

Para que el cálculo sea correcto, es necesario determinar dos cosas:

1. Control interno de calidad inter-día. Para ello es necesario conocer el coeficiente de variación inter-día de los últimos dos-tres meses para cada magnitud a incluir en el estudio, y el número de mediciones realizadas cada mes (si es posible, no menos de treinta valores en total para cada CV, y de forma deseable, los valores de

los tres últimos meses). Se recogerán en la Hoja de Cálculo, junto con otros datos de los controles acumulados

2. Control de calidad específico del estudio. Se deberá incluir **cada día**, en cada lote de medición de las alícuotas de paciente, un **suero control**, al que se le medirán las mismas magnitudes del estudio, de forma simultánea. Esto permitirá descartar que se produce una alteración de los valores, ajena a los factores del estudio (por ejemplo, el fallo de algún reactivo un día concreto, o una calibración incorrecta, etc.). Este suero control debe ser del nivel que se aproxime a los rangos de referencia de cada magnitud (el llamado nivel “normal” o “medio”), ya que la media de los valores de los pacientes estará probablemente próxima a dichos valores “normales”. Los resultados de este control de cada día se anotarán en la Hoja de Cálculo.

8. Recogida y registro de datos.

Se acompaña una Hoja de Cálculo en formato Excel para introducir los resultados de los análisis. Esta Hoja contiene diferentes hojas internas, que se abren pulsando en cada una de las pestañas inferiores.

- a) Identificación del Laboratorio participante: En la primera Hoja se deberá rellenar el nombre del Centro y el Facultativo responsable del estudio, para contactos posteriores, junto con otros datos de identificación.
- b) Valores del Control de Calidad Externo: Se rellenará los datos del Control de Calidad Interno de cada Laboratorio. La codificación usada por la SEQC para su Programa de Control de Calidad Externo permitirá agrupar los resultados de este estudio según las metodologías y equipos empleados en cada Laboratorio participante. Y posteriormente ver si los resultados de estabilidad son independientes del método de medición o no.
- c) Temperaturas en Fase 0: Para comprobar que los sistemas van a trabajar a las temperaturas esperadas, se realizarán unas mediciones antes de realizar el estudio con muestras de pacientes. Los datos se anotan en la hoja correspondiente.

Como puede suceder que, a lo largo del día varíe la temperatura, por ejemplo, en una nevera que se abre muy a menudo durante la mañana, se podrían realizar varias mediciones a lo largo del día de cada sistema (congelador, nevera, temperatura ambiente y baño maría).

Si hubiera diferencias importantes, se debería resolver el problema antes de comenzar a trabajar con las muestras de los pacientes.

- d) Temperaturas en Fase 1: En esta hoja se anotan las temperaturas reales a las que han estado sometidas las muestras, a lo largo de los días del estudio.

- e) Datos de los pacientes: En esta hoja se pueden anotar, opcionalmente, los datos de pacientes, u otras incidencias que se consideren convenientes.
- f) Controles específicos: Para asegurarse que no se han presentado alteraciones en las mediciones que no sean las esperadas y debidas a las variables temperatura y tiempo (por ejemplo, fallo en algun reactivo, etc.) se introducirá con cada tanda de muestras y cada día, un suero control de valor “medio”, que se analiza **simultáneamente** con las muestras de pacientes. Los resultados se anotan en la hoja correspondiente.
- g) Hojas de pacientes: En la primera columna figuran las magnitudes a medir, y en el orden en que aparecen en el Control de Calidad de la SEQC. Este orden se debe respetar, porque luego hay que analizar los datos de todos los Laboratorios participantes. Si no se analiza alguna magnitud, se dejarán las casillas en blanco. Si hay que añadir alguna magnitud que no figura en el listado, se añade en la última fila.

Hay una hoja para cada paciente, cinco en total.

Los encabezamientos de columnas muestran en primer lugar, el espacio para los resultados obtenidos a “tiempo cero”. A continuación se muestran espacios para reflejar resultados obtenidos en diferentes días y en muestras sometidas a diferente temperatura.

En aquellos Laboratorios en los que esto sea posible, se adelantará mucho trabajo de teclear datos, y se evitarán errores de transcripción, si se pueden obtener estos datos en formato EXCEL a partir del Sistema Informático del Laboratorio, y luego trasladarlos a la Hoja Excel que se acompaña.

En cualquier caso, no se aceptará otro formato que el que se suministra. La enorme cantidad de datos a analizar, y la complejidad de los tratamientos, obligan a los componentes del Grupo de estudio a excluir los formatos que no sean compatibles.