

Protocolo para el estudio de la estabilidad de las magnitudes biológicas

Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular
Comité de Garantía de la Calidad y Acreditación de Laboratorios

Grupo de Trabajo¹. Taller «Jornadas del siglo XXI» 2002. «Fase preanalítica. Estabilidad de las muestras. Datos bibliográficos y estudios de campo (propuesta de protocolo para el estudio de la estabilidad)».

Documento A, Fase 3, Versión 1

Preparado por: M. J. Alsina, V. Álvarez, M. Bueno, M. Cortés, J.V. García Lario, C.V. Jiménez, M. Martínez, C. Martínez Bru, J. Minchinela, R. López, P. Planells, C. Ricós, A. Salas, F. Ramón y P. Rosique en colaboración con la Comisión de Calidad Analítica

ÍNDICE

0. Introducción
1. Protocolo de estudio
2. Material y métodos
 - 2.1. Ámbito de aplicación
 - 2.2. Selección de pacientes
 - 2.3. Criterios de exclusión de pacientes y muestras
 - 2.4. Recogida de especímenes
 - 2.5. Variables a estudiar
3. Descripción del protocolo
 - 3.1. Modelos propuestos
4. Condiciones de conservación de las muestras
5. Recogida de datos
6. Análisis de datos
7. Conclusiones
8. Bibliografía

0. INTRODUCCIÓN

El modelo de concentración de laboratorios clínicos y descentralización de los módulos de extracción y recogida de muestras en nuestro entorno ha provocado que las muestras biológicas humanas se transporten y conserven en condiciones que pueden afectar a la estabilidad de todas o varias de las propiedades físico-químicas de sus componentes, sin que se conozca con certeza la repercusión sobre la calidad final de los resultados emitidos.

La estabilidad metrológica de las propiedades físico-químicas de los componentes de especímenes biológicos humanos es un concepto definido por Guder (1) como «la capacidad de una muestra de retener el valor inicial de las magnitudes biológicas dentro de unos límites establecidos durante un determinado periodo de tiempo cuando ésta se conserva en condiciones definidas».

Existen recomendaciones generales sobre el tiempo y la temperatura más adecuada para la determinación de la mayoría de las magnitudes biológicas. Así, el National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS) (3,4) recomienda que deben analizarse antes de las 2 horas de su obtención y mantenerse a temperatura ambiente.

El conocimiento de la estabilidad de las muestras toma especial relevancia debido a que existen diferentes recomendaciones. A nivel nacional, se conocen las publicadas en la Base de datos del INSALUD (2). Internacionalmente se encuentran las recomendaciones realizadas por el NCCLS para determinados tipos de especímenes, así como las de diferentes grupos de trabajo y Sociedades Científicas (1,5-8).

Diversos estudios (9-11) han demostrado que la inadecuada conservación de las muestras antes de su procesamiento influye o modifica la estabilidad de algunas de las propiedades físico-químicas de sus componentes, provocando que el resultado obtenido sea significativamente diferente del resultado que se obtendría si la muestra se preparase y procesase en condiciones idóneas.

Entre las variables que afectan a la estabilidad se encuentran:

- Condiciones en el transporte de las muestras: temperatura, tiempo y alteraciones mecánicas, como vibración, a las que son sometidos los especímenes durante su transporte.
- Condiciones en la conservación de la muestra desde la extracción hasta su centrifugación o preparación previa al procesamiento: forma de almacenamiento, evaporación, decantación o separación en alícuotas, temperatura de conservación y tiempo transcurrido.

Otros factores que pueden influir en la estabilidad de las muestras biológicas son:

- Condiciones inherentes al sujeto relacionadas con la variabilidad biológica intraindividual, como factores fisiológicos, patológicos, ingesta de fármacos, y regulación homeostática.
- Condiciones de obtención de la muestra, tales como la dificultad de la extracción, tiempo de aplicación del torniquete y tiempo total del procedimiento de extracción.
- Condiciones propias al contenedor de la muestra: componentes intrínsecos del material, aditivos, conservantes y fases de separación.
- Metodología analítica empleada y propiedad físico-química que se mide.

También se conoce que todas las variables anteriormente citadas afectan por desigual a los diferentes componentes de la muestra. Algunas propiedades físico-químicas son más sensibles que otras a la acción de estos factores, no se alteran en la misma cuantía y la acción de alguna de las variables puede influenciar con signo contrario sobre diferentes componentes de una misma muestra.

Los numerosos estudios realizados sobre el tema muestran, en algunos casos, falta de consenso o resultados contradic-

¹Composición del Grupo de Trabajo: M.J. Alsina, M.J. Martínez de Osaba, J.L. Castaño, M. Martínez, C. González, J.M. Navarro, J.L. Marín, M.A. Aguilar, A. Salas, I. Caballé, M. Esteban, C. López, J.V. García Lario, M. Granada, R. Güell, A. Ortíz de Apodaca

torios, como queda constancia en el estudio bibliográfico realizado por la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular en el año 2001 (12), donde se revisaron las principales recopilaciones hasta el momento, así como toda la bibliografía de los últimos cuatro años.

Los estudios, en general (7,10), están realizados en condiciones experimentales y no reproducen la práctica diaria de los laboratorios clínicos. Otro inconveniente adicional es que son estudios sobre una o pocas magnitudes (10). Por último, la mayoría de estudios son intrahospitalarios (7,10), con resultados difícilmente transferibles a laboratorios que trabajen en condiciones diferentes de las que se exponen, y en los que no se tiene en cuenta una de las variables principales propuestas en este protocolo como es la influencia de la agitación o vibración a la que están sometidas las muestras durante su transporte por carretera.

1. PROTOCOLO DE ESTUDIO

Es necesario definir un protocolo para estudiar la influencia que pueden tener las diferentes variables, como temperatura, agitación (transporte) y tiempo desde la obtención del espécimen hasta su procesamiento, en la estabilidad de las magnitudes biológicas humanas. Dichas variables se agrupan en diferentes modelos, asignando un número de 30 individuos al estudio de cada modelo.

Se toma como *muestra de referencia* (M1), para cada uno de los individuos y cada una de las magnitudes en estudio, aquella que no es sometida a transporte, que se conserva a una temperatura entre +21 y +25 °C y que es procesada en un intervalo de tiempo entre 90 y 120 minutos desde su obtención. Para el estudio de la estabilidad de glucosa y potasio, o de otras magnitudes con estabilidades más cortas (según datos bibliográficos), este tiempo debe estar comprendido entre 30 y 45 minutos. El resto de muestras de cada individuo se someten a la influencia de los diferentes modelos.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Ámbito de aplicación

El estudio se debe realizar en el lugar de extracciones del laboratorio o en puntos de extracción que se encuentren en el mismo edificio del laboratorio.

2.2. Selección de pacientes

La asignación de los sujetos al estudio se realiza de forma aleatoria entre todos los que acuden, por prescripción de su médico, al centro de extracción previamente determinado, durante el periodo de tiempo necesario hasta completar el número de sujetos predefinidos. A todos ellos se les pide el consentimiento informado.

Los pacientes deben permanecer en ayunas un mínimo de 12 horas (13) previas a la extracción de sangre.

2.3. Criterios de exclusión de pacientes y muestras

Quedarán excluidos:

- Pacientes que denieguen su consentimiento.
- Muestras obtenidas en extracciones difíciles o que no se ajusten al protocolo de extracción previamente estandarizado.
- Muestras obtenidas en condiciones distintas al tiempo y temperatura establecidos en los modelos definidos más adelante.

- Muestras hemolizadas o hiperlipídicas, observables visualmente o rechazadas por los procedimientos de medida (podrían interferir en los resultados de las determinaciones realizadas).

La exclusión por alguno de estos sucesos indicará la asignación de un nuevo paciente en el estudio, según el modelo definido anteriormente, hasta completar los diferentes grupos de 30.

2.4. Recogida de especímenes

Para todas las muestras incluidas en todos los laboratorios que realicen el estudio, se estandariza la recogida siguiendo las recomendaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Cada muestra de sangre será tratada en función de las características del modelo de estudio escogido, tanto en los referentes a la extracción de sangre como a la centrifugación, cuando proceda. También se estandariza el tiempo de transporte (2 y 4 horas). Se controla la temperatura ambiental del lugar de la extracción, del transporte y en el laboratorio.

Para cada uno de los modelos del estudio y para cada sujeto, ya sea para determinaciones en suero, sangre u orina, se obtiene la muestra de referencia descrita anteriormente.

2.5. Variables a estudiar

Se tendrán en cuenta las variables de agitación, temperatura y tiempo.

- *Agitación*: En función del modelo de estudio, algunas muestras serán transportadas en las condiciones habituales, realizando un recorrido por carretera o ciudad durante un periodo de 2 y de 4 horas. También se pueden hacer estudios con otros sistemas de transporte dentro del hospital, por ejemplo el tubo neumático.
- *Temperatura*: Se estudiarán las siguientes situaciones:
 - temperatura de conservación no controlada y registrada.
 - temperatura de conservación controlada entre +21 y +25 °C y registrada.
 - temperatura de conservación controlada entre +4 y +8 °C y registrada.
- *Tiempo*: intervalo de tiempo desde la extracción hasta la obtención del resultado, con o sin centrifugación previa de la muestra:
 - T1: 90-120 minutos (30-45 minutos para las determinaciones de glucosa, ion potasio u otras magnitudes)
 - T2: 210-240 minutos
 - T3: 330-360 minutos
 - T4: 450-480 minutos
 - T5: 24 horas
 - T6: 48 horas
 - T6bis: en lugar de 48 horas, se puede realizar a la semana para determinaciones poco frecuentes (autoinmunidad, algunos marcadores tumorales, algunas hormonas, etc.).

3. DESCRIPCIÓN DEL PROTOCOLO

Para cada una de las magnitudes seleccionadas, el protocolo se desarrolla en tres fases. En cada una de las fases los modelos aplicados serán los mismos (A, B, C y D), pero cambiando las variables temperatura y agitación:

- Primera fase: temperatura de conservación no controlada y registrada.
- Segunda fase: temperatura de conservación controlada entre +21 y +25 °C y registrada.

- Tercera fase: temperatura de conservación controlada entre +4 y +8 °C y registrada.

3.1. Modelos propuestos

- Modelo A – Con agitación y sin centrifugación previa
Consiste en extraer 3 tubos (M1, M2, M3) a cada sujeto en el propio laboratorio o en el mismo edificio del laboratorio:
 - M1: el tubo se queda en el laboratorio y es tratado como muestra de referencia. Se analiza en el tiempo T1.
 - M2: se coloca en una nevera portátil con un termómetro de máxima y mínima y se da al transportista para que haga el recorrido de 2h. Se centrifuga y analiza en el tiempo T2.
 - M3: se coloca en una nevera portátil con un termómetro de máxima y mínima y se da al transportista para que haga el recorrido de 4h. Se centrifuga y analiza en el tiempo T3.

Cuando sea posible, en lugar de un termómetro de máxima y mínima se utilizará un sistema de registro continuo de temperatura.

- Modelo B – Con agitación y centrifugación previa
Consiste en extraer 3 tubos (M1, M2, M3) a cada sujeto en el propio laboratorio o en el mismo edificio del laboratorio:
 - M1: el tubo se queda en el laboratorio y es tratado como muestra de referencia. Se centrifuga y se analiza en el tiempo T1.
 - M2: se centrifuga y se coloca en una nevera portátil con un termómetro de máxima y mínima y se da al transportista para que haga el recorrido de 2h. Se analiza en el tiempo T2.
 - M3: se centrifuga y se coloca en una nevera portátil con un termómetro de máxima y mínima y se da al transportista para que haga el recorrido de 4h. Se analiza en el tiempo T3.
- Modelo C – Sin agitación y sin centrifugación previa
Consiste en extraer 3 tubos (M1, M2, M3) a cada sujeto en el propio laboratorio o en el mismo edificio del laboratorio:
 - M1: el tubo se queda en el laboratorio y es tratado como muestra de referencia. Se analiza en el tiempo T1.
 - M2: el tubo se queda en el laboratorio. Se centrifuga y analiza en el tiempo T2.
 - M3: el tubo se queda en el laboratorio. Se centrifuga y analiza en el tiempo T3.
- Modelo D – Sin agitación con centrifugación previa
Consiste en extraer 1 tubo (M1) a cada sujeto en el propio laboratorio o en el mismo edificio del laboratorio:
 - M1: el tubo se queda en el laboratorio y es tratado como muestra de referencia. Se analiza en el tiempo T1, T2, T3, T4, T5 y T6

Si con el modelo A no se encuentran diferencias no hará falta experimentar los modelos B y C. En este caso, se pasará directamente al modelo D y se ensayarán los tiempos T4, T5 y T6. Dado que la mayoría de laboratorios guardan las muestras a +4 °C, en este caso solo se haría el estudio entre +4 y +8 °C.

4. CONDICIONES DE CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

La temperatura de conservación de las muestras durante todo el análisis dependerá de la fase de estudio que se esté realizando. Así, en la primera fase las muestras deberán estar a tem-

peratura ambiente, en la segunda fase a una temperatura entre +21 y +25 °C y en la tercera fase a una temperatura entre +4 y +8 °C. Las muestras deberán permanecer tapadas.

5. RECOGIDA DE DATOS

Se registra la variable tiempo:

- Hora de extracción
- Hora de salida del transporte
- Hora de llegada al laboratorio
- Hora de centrifugación
- Hora de obtención del resultado

Se registra la variable temperatura:

- Temperatura del lugar de la extracción
- Temperatura de transporte
- Temperatura de conservación en el laboratorio

Se registra la edad, sexo, estado fisiológico y patológico de cada sujeto.

6. ANÁLISIS DE DATOS

Se registran los resultados del análisis por duplicado de cada una de las magnitudes biológicas, en cada periodo de tiempo y para cada uno de los modelos estudiados. Siempre se tendrá en cuenta la metodología analítica utilizada.

Se realizarán pruebas de Dixon para la exclusión de los pares cuyos resultados discrepen. En caso que discrepe algún par, se deberán hacer más casos hasta completar en número de 30.

Para cada magnitud biológica y variable estudiada se compararán los resultados de cada una de las muestras (M_n) con su muestra de referencia (M_r). Tomando al azar uno solo de los datos de cada par, se calculará la diferencia porcentual (DP) respecto a la muestra de referencia para los 30 pacientes, aplicando la fórmula siguiente:

$$DP = 100 (\sum(M_i - M_n)^2)^{1/2} / x_{M1}$$

Se comparará este porcentaje con el límite de estabilidad definido en el documento «Definición del límite de estabilidad de las magnitudes en las muestras biológicas».

Si el porcentaje calculado supera el límite de estabilidad propuesto se considerará que la variable estudiada (agitación, temperatura, tiempo) produce pérdida de estabilidad que podría alterar la significación clínica del resultado.

7. CONCLUSIONES

Este documento propone una guía para evaluar la estabilidad de las magnitudes en la muestra biológica humana. Se describe el protocolo a seguir para estimar el efecto de la agitación durante el transporte, la temperatura de conservación y el tiempo transcurrido desde la obtención de la muestra hasta su procesamiento en el laboratorio.

Un segundo documento, preparado por la Comisión de la Calidad Analítica, propone un criterio para establecer cuál es la menor variación en la concentración (o actividad) de una magnitud que, no siendo debida a razones analíticas o biológicas, refleje una pérdida de estabilidad (decremento o incremento) de la magnitud en la muestra biológica, a consecuencia de la cual se produzca un error superior al clínicamente permisible. Es decir, formula un criterio para definir el límite de variación que implique pérdida de la estabilidad de las magnitudes biológicas en las muestras del laboratorio clínico.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Guder W. The quality of diagnostics samples. Recommendations of the Working group on Preanalytical of the German Society for Clinical Chemistry and the German Society of Laboratory Medicine. Verlag 2001.
2. Base de datos del Insalud. <http://www.msc.es/insalud/docpub/memy-catalogos/laboratorios>.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS). Procedures for the handling and processing of blood specimens. Approved guidelines. Second ed. NCCLS document H18-A2. NCCLS Wayne PA, USA 1999.
4. National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS). Procedures for the handling and transport of diagnostic specimens and etiologic agents- Third ed, approved standard. NCCLS document H5-A3. NCCLS. Wayne PA, USA 1994.
5. College of American Pathologist (CAP). Patient preparation and specimen handling. Fascicles VI, 1992 and VII, 1996.
6. College of American Pathologist (CAP). Clinical laboratory handbook for patient preparation and specimen handling. Suppl. for physician office laboratories, 1993.
7. Young, D.S. Effects of preanalytical variables on clinical laboratory test. 2nd ed. Washington DC: AACC press, 1997.
8. European Committee for Laboratory Medicine. European Urinalysis Guidelines, Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation. Juny 2000.
9. Sheshadri Narayanan. The preanalytical phase. An important component of laboratory medicine. Am J Clin Pathol 2000; 113:429-52.
10. Bobby L, Boyanton Jr and Kenneth E. Blick. Stability studies of twenty-four analytes in Human plasma and serum. Clin Chem 2002; 48:12:2242-7.
11. Cruz LM, Monge N, Valero J, Fuentes X. Estabilidad de las magnitudes bioquímicas. Quim Clin 2002; 21:52-61.
12. González-Oller C, Alsina MJ. Base de datos sobre estabilidad de las magnitudes biológicas. <http://seqc.es/bd/soloverdes.html>
13. Comisión de Lípidos y Lipoproteínas de la SEQC. Protocolo para la estandarización de la fase preanalítica en la medición de lípidos y lipoproteínas. Quim Clin 2004;23:137-40.

Correspondencia:
SEQC
Comisión de Calidad Extraanalítica
c/ Padilla, 323
08025 Barcelona