

2013

ESTIMACIÓ DE LA INCERTESA DE MESURA DELS PROCEDIMENTS DE REFERÈNCIA PRIMARIS PER A LA
MESURA DE LA CONCENTRACIÓ CATALÍTICA DELS ENZIMS EN UN LABORATORI DE REFERÈNCIA.

LAURA RAMI BRUALLA



UAB

Universitat Autònoma
de Barcelona

TESI DOCTORAL

**ESTIMACIÓ DE LA INCERTESA DE MESURA DELS
PROCEDIMENTS DE REFERÈNCIA PRIMARIS PER A LA
MESURA DE LA CONCENTRACIÓ CATALÍTICA DELS
ENZIMS EN UN LABORATORI DE REFERÈNCIA**



LAURA RAMI BRUALLA

Dirigida per la Dra. FRANCESCA CANALIAS REVERTER

*Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Medicina,
GENER 2013*

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona

*Memòria presentada per aspirar a Grau de
Doctor per Laura Rami Brualla.*

Vist i plau:

Dr. Francesca Canalias Reverter

28 de gener del 2013

TESI DOCTORAL

**ESTIMACIÓ DE LA INCERTESA DE MESURA DELS
PROCEDIMENTS DE REFERÈNCIA PRIMARIS PER A LA MESURA
DE LA CONCENTRACIÓ CATALÍTICA DELS ENZIMS EN UN
LABORATORI DE REFERÈNCIA**

Autor: Laura Rami Brualla

Director: Dra. Francesca Canalias Reverter

Departament de Bioquímica i Biologia
Mol·lecular de la Facultat de Medicina de
la Universitat Autònoma de Barcelona.

Gener 2013

AGRAÏMENTS

Vull agrair la col·laboració de totes aquelles persones que d'una manera o d'una altra han fet possible la realització d'aquesta tesi doctoral.

En primer lloc a la meva directora de tesi. A la Dra. Francesca Canalias que va dipositar la seva confiança en mi per dur a terme aquest treball. També li he d'agrair els seus comentaris, revisions i el seu suport al llarg de tots aquests anys.

A la comissió de seguiment de la tesi doctoral, formada pel Dr. Javier Gella i les doctores Anna Bassols i Josefina Mora pels seus comentaris durant les presentacions del meu treball.

Al Xavier Gutierrez i a BioSystems per la seva ajuda en l'administració de sèrums humans i de reactius.

Al Xavier Fuentes per oferir-me un lloc a la Secció d'Estadística i Metrologia de l'ACCLC i per proporcionar-me diversa informació basada en la incertesa de mesura.

A l'Eduard Girabent, per estar sempre al meu costat donant-me forces i animant-me, i per suportar els meus canvis d'humor, especialment, durant el període de redacció de la tesi. També agrair a la meva família, que sempre hi es fen-te costat, el seu amor i el seu suport continu. Als animalons de la casa, la Cuca, la Freya i en Kalu per la seva companyia.

Als amics, que encara que amb alguns no es veiem gaire, sempre tenen unes paraules per pujar-te l'autoestima.

Als becaris i companys del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Medicina de l'UAB per la seva grata companyia durant els dinars i els "tea breaks".

Moltes gràcies a tots pel vostre granet de sorra.

ÍNDIX

1.	INTRODUCCIÓ.....	11
1.1.	Conceptes metroològics.....	11
1.1.1.	Error de mesura.....	11
1.1.1.1.	Error aleatori.....	13
1.1.1.2.	Error sistemàtic.....	15
1.1.2.	Incertesa de mesura.....	18
1.1.3.	Incertesa de mesura versus error de mesura.....	20
1.1.4.	Traçabilitat metroològica.....	22
1.2.	Estandardització: Sistemes de mesura de referència.....	24
1.2.1.	Sistema de mesura de referència d'enzims.....	30
1.3.	Laboratoris de Referència.....	33
1.3.1.	Les normes ISO.....	34
1.3.2.	El Laboratori de Referència d'Enzimologia Clínica.....	35
1.3.2.1.	Assegurament de la qualitat dels resultats de mesura.....	37
2.	OBJECTIUS.....	39
3.	MATERIALS I MÈTODES.....	40
3.1.	Procediments de mesura de referència.....	40
3.1.1.	Reactius.....	40
3.1.2.	Equips.....	40
3.1.3.	Mostres.....	45
3.1.3.1.	Processament de les mostres.....	45
3.2.	Estimació de la incertesa de mesura.....	46
3.2.1.	Definició del mesurand.....	47
3.2.2.	Identificació de les fonts d'incertesa.....	48
3.2.3.	Estimació de la incertesa estàndard.....	50
3.2.3.1.	Distribucions de freqüències.....	52
3.2.3.2.	Incertesa estàndard de tipus A.....	54
3.2.3.3.	Incertesa estàndard de tipus B.....	56
3.2.4.	Estimació de la incertesa combinada.....	57
3.2.4.1.	Coeficients de sensibilitat.....	58

3.2.4.2.	Fonts d'incertesa independents.....	60
3.2.4.3.	Fonts d'incertesa correlacionades.....	60
3.2.4.4.	Combinació simplificada	61
3.2.5.	Estimació de la incertesa expandida	62
3.2.6.	Expressió de la incertesa de mesura	65
4.	RESULTATS.....	66
4.1.	γ -Glutamiltransferasa	66
4.1.1.	Definició del mesurand	66
4.1.2.	Identificació de les fonts d'incertesa.....	67
4.1.3.	Estudi de les fonts d'incertesa: estimació de la incertesa estàndard i càlcul dels coeficients de sensibilitat.....	69
4.1.3.1.	Reactius.....	69
4.1.3.1.1.	Qualitat de l'aigua.....	69
4.1.3.1.2.	Interferents i lots dels reactius.....	69
4.1.3.1.3.	Contingut d'aigua dels reactius	73
4.1.3.1.4.	Puresa dels reactius	73
4.1.3.1.5.	Caducitat dels reactius.....	74
4.1.3.2.	Solucions de reacció i d'inici	75
4.1.3.2.1.	Massa dels reactius.....	75
4.1.3.2.2.	Ajust del pH	76
4.1.3.2.3.	Arrasament de les solucions.....	78
4.1.3.2.4.	Caducitat de les solucions	80
4.1.3.3.	Espectròmetre.....	82
4.1.3.3.1.	Longitud d'ona.....	82
4.1.3.3.2.	Exactitud de les absorbàncies	83
4.1.3.3.3.	Linealitat.....	85
4.1.3.3.4.	Altres fonts d'incertesa:.....	86
4.1.3.4.	Mesures.....	87
4.1.3.4.1.	Temperatura.....	87
4.1.3.4.2.	Fracció de volum de mostra	89
4.1.3.4.3.	Temps de preincubació	91
4.1.3.4.4.	Cubetes.....	92

4.1.3.5.	Factors de correcció.....	93
4.1.3.5.1.	Blanc de reactiu	93
4.1.3.5.2.	Massa de l'aigua de reconstitució del liofilitzat	94
4.1.3.5.3.	Volum dispensat	95
4.1.3.5.4.	Densitat de l'aigua de reconstitució dels liofilitzats	97
4.1.3.6.	Processament de les dades.....	97
4.1.3.6.1.	Arrodoniment	97
4.1.3.6.2.	Valors aberrants.....	97
4.1.3.6.3.	Coeficient d'absorció molar	98
4.1.3.7.	Variabilitat: imprecisió en condicions intermèdies.....	99
4.1.3.8.	Tractament de les mostres	100
4.1.3.8.1.	Temperatura de l'aigua de reconstitució del liofilitzat.....	100
4.1.3.8.2.	Temps i temperatura durant la reconstitució	101
4.1.3.8.3.	Blanc de mostra	103
4.1.3.8.4.	Dilució de les mostres	103
4.1.3.9.	Estabilitat de l'enzim GGT a les mostres.....	105
4.1.4.	Estimació de la incertesa combinada	106
4.1.5.	Estimació de la incertesa expandida	109
4.2.	Creatina cinasa	111
4.2.1.	Definició del mesurand	111
4.2.2.	Identificació de les fonts d'incertesa.....	112
4.2.3.	Estudi de les fonts d'incertesa: estimació de la incertesa estàndard i càlcul dels coeficients de sensibilitat.....	112
4.2.3.1.	Reactius.....	113
4.2.3.1.1.	Interferents i lots de reactiu.....	113
4.2.3.1.2.	Contingut d'aigua dels reactius	114
4.2.3.1.3.	Caducitat dels reactius	115
4.2.3.2.	Solucions de reacció i d' inici.....	116
4.2.3.2.1.	Massa dels reactius.....	116
4.2.3.2.2.	Ajust de pH	119
4.2.3.2.3.	Arrasament de les solucions.....	121
4.2.3.2.4.	Caducitat de les solucions	123

4.2.3.3.	Espectròmetre	123
4.2.3.3.1.	Longitud d'ona	123
4.2.3.3.2.	Exactitud de les absorbàncies	124
4.2.3.3.3.	Linealitat	126
4.2.3.3.4.	Altres factors d'incertesa	127
4.2.3.4.	Mesures.....	128
4.2.3.4.1.	Temperatura	128
4.2.3.4.2.	Fracció de volum de mostra	129
4.2.3.4.3.	Temps de preincubació	131
4.2.3.4.4.	Cubetes.....	133
4.2.3.5.	Factors de correcció.....	134
4.2.3.5.1.	Blanc de reactiu	134
4.2.3.5.2.	Volum dispensat	135
4.2.3.6.	Processament de les dades.....	137
4.2.3.6.1.	Coeficient d'absorció molar	137
4.2.3.7.	Variabilitat: imprecisió en condicions intermèdies.....	137
4.2.3.8.	Tractament de les mostres	138
4.2.3.8.1.	Temperatura de l'aigua de reconstitució del liofilitzat.....	138
4.2.3.8.2.	Dilució de les mostres	140
4.2.3.9.	Estabilitat de l'enzim CK a les mostres	142
4.2.4.	Estimació de la incertesa combinada	145
4.2.5.	Estimació de la incertesa expandida	148
5.	DISCUSSIÓ.....	150
6.	CONCLUSIONS	166
	BIBLIOGRAFIA	168
	ANNEX 1	175
	ANNEX 2	187

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Conceptes metroològics

1.1.1. *Error de mesura*

És ben conegut que en realitzar varies mesures repetides d'una mateixa mostra no s'obtenen resultats amb els mateixos valors numèrics, aquests valors s'assemblen més o menys entre sí, però mai són iguals. Així doncs, les mesures repetides generen dispersió en els valors dels resultats d'una mostra. Al representar aquests valors en un gràfic de freqüències adopten una distribució de freqüència determinada en funció de la magnitud mesurada.

Les variacions en els valors dels resultats són degudes a l'error de mesura, definit com la diferència que existeix entre el valor d'un resultat d'una determinada mesura i el valor verdader de la magnitud en la mostra mesurada. Per descriure la distribució dels valors dels resultats de mesures repetides s'utilitzen els conceptes de precisió i veracitat. La precisió es defineix com el grau de concordança entre els resultats de mesures repetides, i es relaciona amb la presència d'errors de tipus aleatori. La veracitat és el grau de concordança entre el valor mitjà de les repeticions i el valor verdader, i es relaciona amb la presència d'errors de tipus sistemàtic (1). Així doncs, l'error de mesura està constituït per dos components: l'error aleatori i l'error sistemàtic.

L'existència d'errors de mesura es relaciona amb les característiques metroològiques dels procediments de mesura. Així doncs, un procediment pot causar errors considerables, mentre que un altre procediment diferent, que mesura la mateixa magnitud, pot generar resultats amb errors inapreciables. Per tant, la informació sobre l'origen i la mida dels errors ve donada per l'estudi del procediment de mesura que s'utilitza.

Es considera que un procediment de mesura genera resultats exactes, quan el valor del resultat d'una mesura i el valor verdader concorden entre ells. Això implica que el resultat de la mesura sigui alhora tant veraç com precís (2). L'exactitud és un concepte qualitatiu que està inversament relacionat amb l'error de mesura, i engloba els conceptes de precisió i veracitat (Figura 1).

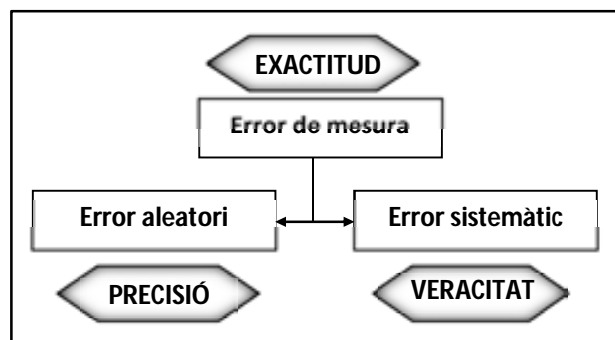


Figura 1. Exactitud i error de mesura.

A la Figura 2 es mostra un resum dels conceptes anteriors. Els tirs a la diana representen la distribució que adopten els valors dels resultats de mesures repetides en diferents situacions, i el centre de la diana és el valor verdader d'una magnitud. Per exemple, es representen diverses mesures d'un analit d'un material de control respecte al valor assignat de l'analit al material de control. A més precisió els valors es troben més propers els uns amb els altres (b i d). Però la veracitat és pitjor en el cas (d), perquè els valors dels resultats es troben distanciats del centre de la diana, generant un biaix (error sistemàtic) significatiu. Per altra banda, els valors es troben més propers al centre de les dianes, és a dir al valor assignat, quan la veracitat és major (a i b), però en el cas (a) la precisió és pitjor. Els valors són poc exactes quan es troben allunyats del valor verdader i són distants entre ells (c)(2).

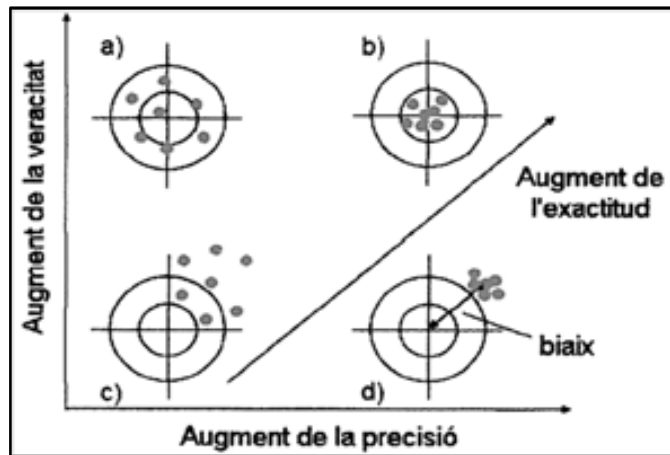


Figura 2. Els tir a la diana mostren la distribució dels valors dels resultats de mesures repetides. El centre de la diana representa el valor verdader del mesurand. a) La dispersió dels valors dels resultats és gran, però s'apropen al valor verdader. b) Els resultats són molt precisos i verços, major exactitud de mesura. c) Els resultats són poc precisos i verços, menor exactitud de mesura. d) Els resultats tenen poca dispersió, però es troben desviats del valor verdader (biaix). (Adaptada de "Terminologia per a les anàlisis. Introducció al VIM 3").

1.1.1.1. Error aleatori

La dispersió dels resultats obtinguts en mesures repetides és deguda a l'existència d'errors aleatoris, que varien de forma impredecible en cadascuna de les mesures realitzades. Aquests tipus d'errors s'ocasionen principalment per factors difícilment controlables del procediment de mesura (3): soroll dels detectors del fotomultiplicador, fluctuacions en la intensitat de llum, sorolls que provenen dels components electrònics dels aparells, variabilitat en el pipeteig, temps i temperatures d'incubació...

L'error aleatori es coneix com la diferència entre el resultat d'una mesura i la mitjana aritmètica dels resultats de mesures repetides.

Quan es realitzen moltes repeticions d'una mateixa mesura s'observa que la distribució de freqüències dels valors dels resultats normalment és de tipus normal o gaussiana. Aleshores, sempre que el resultat de mesura coincideixi amb la mitjana, l'error aleatori és zero. A la Figura 3 es representa una distribució normal dels valors dels resultats de diverses mesures, en que la mitjana aritmètica té un valor de 100 unitats. S'observen dues mesures independents (a) i (b) amb valors de 90 i 105 unitats, respectivament, i amb un error aleatori de -10 unitats per la mesura (a) i de +5 unitats per la mesura (b), sent el primer error menys probable d'obtenir que el segon. S'observa que quant més gran és la mida de l'error aleatori, menor és la probabilitat d'obtenir-lo.

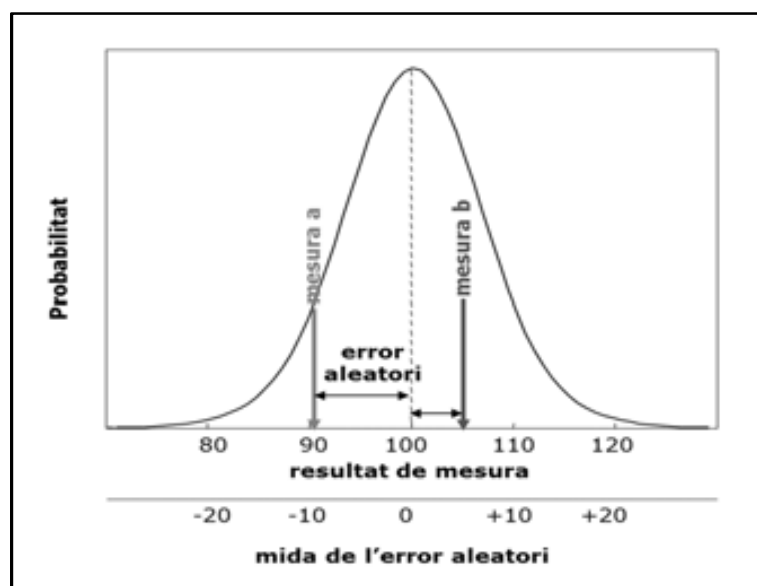


Figura 3. Error aleatori. Es mostra la distribució dels valors dels resultats d'(n) mesures repetides. La línia discontinua representa la mitjana dels valors obtinguts (error aleatori zero). Les mesures (a) i (b) són independents. La primera amb error -10 i la segona amb error +5.

Com s'ha explicat anteriorment, l'error aleatori es relaciona de forma inversa amb la precisió, i per tant, de forma directa amb la imprecisió. La imprecisió és el grau de dispersió que existeix entre els resultats de mesures independents obtingudes sota condicions establertes. Es pot expressar numèricament mitjançant la variància, la desviació estàndard i el coeficient de variació dels resultats obtinguts en mesures repetides. Segons les condicions amb les que s'obtenen els diferents resultats de mesures independents, es pot distingir (4):

- Repetibilitat (imprecisió intraserial): es mantenen constants totes les condicions de mesura i les mesures independents es realitzen en un curt període de temps.
- Reproductibilitat (imprecisió interlaboratorial): es varien totes les condicions de mesura, fins i tot el laboratori.
- Intermèdia (imprecisió interserial): es manté el mateix procediment de mesura i el mateix laboratori, però es varien algunes condicions de mesura com l'operari, el dia, els reactius, etc.

L'error aleatori està causat per factors incontrolables, cosa que fa que la seva correcció no sigui possible, però sí que pot ser reduït o minimitzat. Això s'aconsegueix a partir d'un apropiat manteniment dels aparells, d'una bona instrucció dels operaris i d'un procediment de treball normalitzat.

1.1.1.2. Error sistemàtic

L'error sistemàtic és la diferència entre el valor de la mitjana aritmètica de diferents mesures repetides i el valor verdader de la magnitud mesurada. Així doncs, indica el grau de desviació del resultat de la mesura respecte al seu valor verdader. El resultat de la mesura serà més veraç quan menor sigui la desviació i per tant, menor serà el seu error sistemàtic. Aquest tipus d'error, també és conegut amb el nom de biaix de mesura, que es defineix segons el Vocabulari Internacional de Metrologia (VIM) com l'estimació de l'error sistemàtic (5).

A la Figura 4 es representa la distribució normal dels valors dels resultats de diverses mesures d'una mostra, en que la mitjana aritmètica té un valor de 100 unitats. Es mostra l'error sistemàtic com la diferència de la mitjana i el valor verdader de la magnitud de la mostra, que en aquest cas és de -15 unitats.

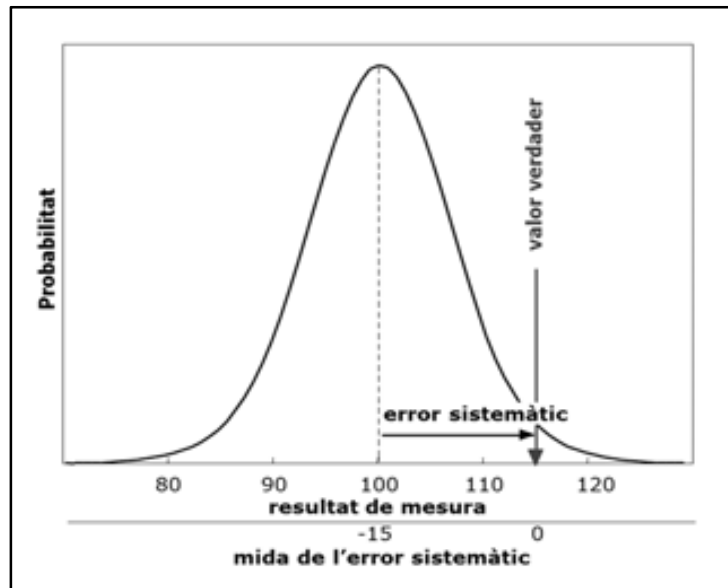


Figura 4. Error sistemàtic. Es mostra la distribució dels valors dels resultats d'(n) mesures repetides. La línia discontinua representa la mitjana dels resultats. El valor verdader del mesurand, representat amb una fletxa vertical, es compara amb la mitjana per obtenir l'error sistemàtic (-15).

Segons el VIM (5) el valor verdader es defineix com un valor de la magnitud que és considerat com a únic i, a la pràctica, impossible de conèixer. També és considerat un concepte teòric, ja que en general no es pot conèixer aquest valor de les magnituds analitzades per cadascuna de les mostres que es mesuren en un laboratori. Per tant, es parla d'un valor convencional (5), que és aquell valor atribuït a la magnitud per un propòsit determinat, o d'un valor de referència metrològic (1), que és un valor de la magnitud acordat que serveix per la comparació. Es parla d'un valor de referència en els següents casos: quan s'ha assignat un valor a un material de referència, quan s'ha assignat un valor a un material mitjançant un procediment de mesura de referència, i quan s'ha obtingut un valor de consens de la magnitud d'un material mitjançant un exercici de comparació entre laboratoris o mitjançant un programa d'avaluació externa de la qualitat.

Les principals causes d'error sistemàtic són (3):

- un calibratge incorrecte, per errors en el valor assignat al calibrador o a un procediment de calibratge inadequat.
- la inespecificitat metrological del procediment de mesura. S'entén com a inespecificitat el grau en que el valor d'una magnitud es veu afectada per altres propietats o components de la mostra que no siguin el propi mesurand. Aleshores, un procediment de mesura serà molt específic quan existeixin poques magnituds interferents.

És important destacar que l'error degut al calibratge afecta als resultats de totes les mostres mesurades, mentre que els errors deguts a la inespecificitat només afecten a aquelles mostres que continguin interferents. Un error sistemàtic conegut s'ha d'evitar o corregir sempre que sigui possible, sobretot quan és un error degut al calibratge. Per altra banda, és difícil detectar la presència d'alguns interferents a les mostres. Només és possible prevenir l'error sistemàtic en alguns casos coneguts, com per exemple quan l'interferent té una propietat visual, com ara el color.

Es distingeixen dos tipus d'errors sistemàtics, els constants i els proporcionals (3). Els primers, com el seu nom indica, representen un mateix valor absolut per qualsevol valor o concentració de la magnitud mesurada. Els segons, representen un valor que varia augmentant o disminuint de forma proporcional al valor de la magnitud mesurada. S'ha de tenir en compte que moltes vegades poden donar-se els dos tipus d'errors a la vegada.

1.1.2. Incertesa de mesura

El valor verdader d'una magnitud a mesurar és sempre desconegut, degut a la presència d'imperficcions en els procediments de mesura que generen tant errors aleatoris com errors sistemàtics. Per tant, el resultat de qualsevol mesura és sempre aproximat, i només es pot aspirar a obtenir un valor de la magnitud que es trobi situat amb gran seguretat a prop del valor verdader de la magnitud. Una mesura amb rigor metrollògic ha d'expressar el grau d'inexactitud del valor d'un resultat, que es quantifica amb la incertesa de mesura (6). La incertesa de mesura expressa el dubte existent al voltant del valor d'un resultat d'una determinada mesura. Així doncs, no deixa de ser una concepte que dona informació sobre la qualitat del resultat, ja que a major incertesa més dubte hi ha sobre si el resultat correspon al valor verdader de la magnitud mesurada.

Segons el VIM (5) la incertesa de mesura es defineix com el paràmetre no negatiu que caracteritza la dispersió dels valors atribuïts al mesurand a partir de les informacions utilitzades.

La incertesa de mesura, per tant, engloba tots aquells components que generen dispersió dels valors del mesurand. Aquests components són les anomenades "fonts d'incertesa", per identificar-les es necessari revisar detalladament el procediment de mesura de la magnitud mesurada. La incertesa de cada font s'expressa com una desviació estàndard (incertesa estàndard), i la incertesa de mesura és el sumatori de totes les incerteses de cadascuna de les fonts identificades. Aquesta es pot expressar en unitats de desviació estàndard (incertesa combinada), o com l'amplada d'un interval amb una probabilitat de cobertura determinada (incertesa expandida) (7).

A la Figura 5 es representa la distribució de probabilitats dels valors d'un mesurand, que és de tipus normal. El valor verdader del mesurand correspon al valor de la mitjana aritmètica del mesurand. La incertesa es representa com l'amplada de la distribució, que s'estima a partir de la desviació estàndard dels valors del mesurand. La incertesa de la mesura es mostra com un interval on es troben el 95 % dels valors de la distribució, en aquest cas equival a ± 2 desviacions estàndard. Al realitzar una mesura és desconegut el valor del resultat dins la distribució i respecte el valor verdader del mesurand, però a partir d'un estudi de precisió del procediment de mesura es pot conèixer l'amplada de la distribució, i estimar la incertesa de mesura (3).

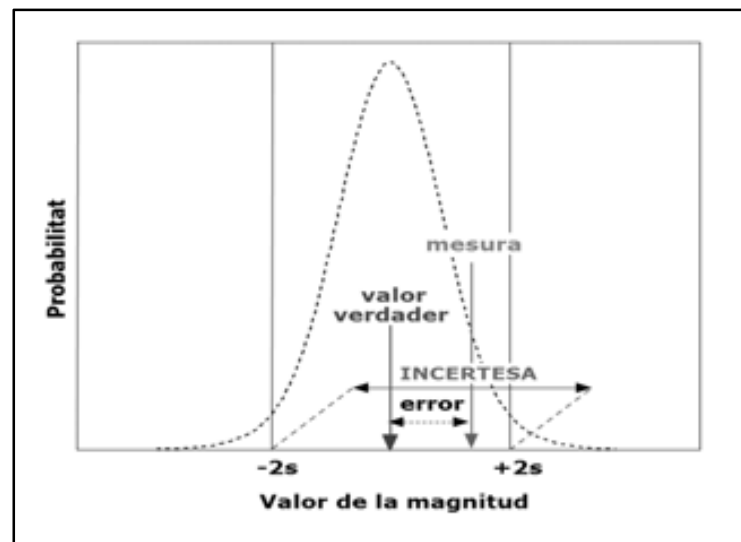


Figura 5. Incertesa de mesura. La corba representa la distribució dels valors del mesurand, tenint en compte els components de la incertesa. L'amplada de la distribució representa la incertesa de mesura, expressada com ± 2 desviacions estàndard (pel 95 % de confiança). Es mostra l'error de mesura a partir del valor d'una única mesura i el valor verdader.

La millor manera d'expressar el resultat d'una mesura amb una bona exactitud és considerant la seva incertesa de mesura (3). Un resultat s'informa de la següent manera: valor del resultat \pm incertesa expandida seguit de les unitats del mesurand. El valor del resultat representa el valor mig de l'interval i el \pm incertesa expandida representa els límits de l'interval. Aquest interval generat per la incertesa de la mesura inclou el valor verdader del mesurand. Per exemple, la mesura de la creatina cinasa d'una mostra genera un resultat de 40,5 μ kat/L, si es considera la incertesa de mesura, el valor es

transforma en un interval de $40,5 \pm 0,9 \mu\text{kat/L}$. El valor verdader de la creatina cinasa de la mostra es troba en l'interval de 39,4 a $41,4 \mu\text{kat/L}$.

1.1.3. Incertesa de mesura versus error de mesura

No sempre és possible calcular l'error de mesura ja que, a vegades, no es pot conèixer el valor verdader o de referència del mesurand. Per altra banda, se sap que el component aleatori de l'error varia d'una mesura a una altra i que el component sistemàtic pot trobar-se o no corregit. Aquesta desconexença de l'error comès al realitzar una única mesura d'una magnitud, genera un dubte sobre el valor del resultat. Estudiant de manera exhaustiva el procediment de mesura és possible estimar aquest dubte, o sigui l'anomenada incertesa de mesura.

La incertesa de mesura està causada per la interacció d'errors que generen dispersió al voltant del valor estimat del mesurand, per tant quant menor sigui la dispersió, menor serà la incertesa.

A la Figura 6 es mostra la contribució dels errors de mesura a la incertesa de mesura. L'error aleatori produït per diferents factors genera una incertesa determinada ja que produeix una dispersió dels valors del mesurand. Per altra banda, l'error sistemàtic genera una desviació del valor de la magnitud mesurada respecte el valor verdader de la magnitud. L'error sistemàtic sempre que es conegui i es quantifiqui s'ha de corregir. La correcció de l'error genera una incertesa que es relaciona amb el grau de certesa de la pròpia correcció. Si l'error sistemàtic no és eliminat perquè es desconeix o no es possible quantificar-lo, contribuirà com un component més a la incertesa de mesura.

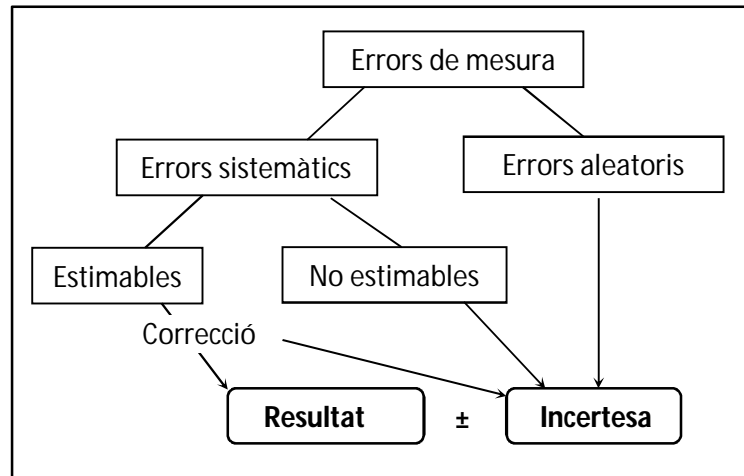


Figura 6. Dels errors de mesura a la incertesa de mesura.

És important no confondre la incertesa de mesura amb l'error de mesura, ni considerar que un representa a l'altre. A continuació, es comparen els dos conceptes per aclarir les seves diferències:

- L'error de mesura posseeix dos components, l'aleatori i el sistemàtic. La incertesa de mesura és única.
- L'error de mesura representa un únic valor i la incertesa un interval de valors.
- L'error de mesura és únic i diferent per cadascuna de les mesures realitzades per un mateix mesurand amb un mateix procediment de mesura. La incertesa de mesura és igual per tots els resultats d'un mateix procediment.
- L'error de mesura pot utilitzar-se per corregir el resultat de la mesura, però per la incertesa no és possible.
- L'error de mesura és una diferència d'una mida determinada del valor d'un resultat respecte a un valor verdader, i es relaciona amb les característiques d'exactitud (qualitativa) i d'incertesa (quantitativa) dels resultats.

La Figura 7 resumeix i relaciona els conceptes metrologicals error de mesura, exactitud i incertesa. L'error de mesura està format per dos components, l'error aleatori i l'error sistemàtic, que es descriuen mitjançant les característiques qualitatives (inversament relacionades) de precisió i de veracitat, respectivament. La precisió es quantifica mitjançant la desviació estàndard i la veracitat mitjançant el biaix. Aquests dos components quantitius contribueixen en el càlcul de la incertesa de mesura per descriure com és l'exactitud del valor d'un mesurand. Per exemple, si la incertesa de mesura és petita, el valor del mesurand serà exacte, és a dir, serà veraç i precís a la vegada, i la probabilitat d'obtenir un error de mesura elevat serà molt baixa.

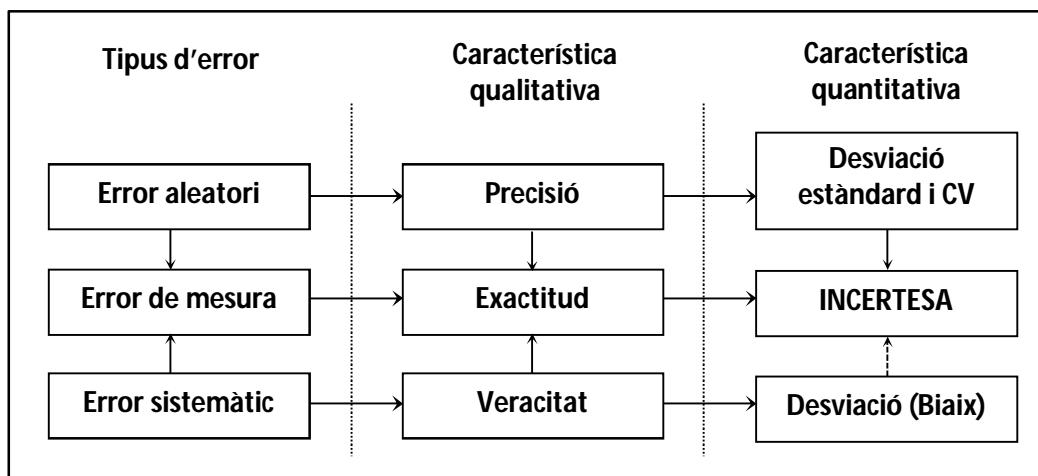


Figura 7. Relació dels conceptes metrologicals, error i incertesa de mesura.

1.1.4. Traçabilitat metrologicala

La traçabilitat metrologicala es defineix pel VIM (5) com la propietat d'un resultat de mesura gràcies a la qual aquest resultat pot ser relacionat amb una referència mitjançant una cadena ininterrompuda i documentada de calibratges, que contribueixen a la incertesa de mesura.

La "referència" esmentada en la definició pot ser una unitat de mesura, un procediment de mesura, que inclou la unitat de mesura, llevat que es tracti d'una magnitud ordinal, o un patró de mesura (2).

- Una unitat de mesura. El sistema d'unitats acordat i utilitzat gairebé universalment en la ciència és el Sistema Internacional (SI) (8). El SI defineix les unitats base de les magnituds de massa (quilograms (kg)), longitud (metre (m)), temps (segon (s)), temperatura termodinàmica (kelvin (K)), corrent elèctric (ampere, (A)), intensitat lluminosa (candela (cd)) i quantitat de massa (mol (mol)). També defineix moltes altres unitats que deriven de les unitats base, com per exemple la velocitat (m/s) i l'activitat catalítica (mol/s).
- Un procediment de mesura. Ha d'estar perfectament definit i consensuat a nivell internacional, per exemple, els procediments de mesura de referència primaris de la *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (IFCC) per la mesura de la concentració catalítica.
- Un patró de mesura. Definit pel VIM (5) com la materialització de la definició d'una magnitud determinada, amb un valor determinat i una incertesa de mesura associada, utilitzada com referència. Per exemple, una solució patró de pH ($4,00 \pm 0,05$) o un material de referència certificat.

La *International Laboratory Accreditation Cooperation* (ILAC) considera que els elements necessaris per a confirmar la traçabilitat metrològica són una cadena de traçabilitat metrològica ininterrompuda fins a un patró internacional o un patró nacional, una incertesa de mesura documentada, una competència tècnica reconeguda, la traçabilitat metrològica al SI d'Unitats i uns intervals entre calibratges (9).

La cadena de traçabilitat està basada en una jerarquia de calibratges. Aquesta seqüència de calibratges pot ser més o menys extensa segons la situació, però sempre comença des d'una referència fins al sistema de mesura final, i el resultat de cada calibratge depèn del resultat del precedent.

La traçabilitat metrològica està íntimament lligada amb la incertesa. Cadascun dels valors dels calibradors té una incertesa associada que s'acumula al calibratge posterior augmentant la incertesa de mesura. Però, la traçabilitat metrològica d'un resultat de

mesura no garanteix que la incertesa de mesura sigui adient a un objectiu determinat ni que hi hagi absència d'errors humans (5). Els valors dels resultats de les diferents mesures es troben definits tant per la seva incertesa com per la seva traçabilitat metrològica (3). Així, la incertesa de mesura és un valor associat al resultat que quantifica el dubte d'aquest resultat i la traçabilitat és una qualitat del resultat que mostra la seva comparabilitat amb una referència.

1.2. Estandardització: Sistemes de mesura de referència

El principal objectiu del laboratori clínic és donar informació útil que ajudi a prendre decisions clíniques adequades per tal d'afavorir una bona assistència sanitària dels pacients. Aquest objectiu s'assoleix únicament si es generen resultats analítics exactes, que permetin donar interpretacions clíniques correctes. Els resultats del laboratori clínic són útils per al diagnòstic, pronòstic, tractament, monitoratge dels pacients i detecció precoç de malalties. Així doncs, resultats inadequats, incorrectes o de mala qualitat tenen greus conseqüències en la pràctica de la medicina, en el sistema de salut i, en conclusió, en el pacient (10).

Per altra banda, un dels problemes més importants dels laboratoris clínics és la manca de comparabilitat entre els resultats analítics obtinguts amb diferents procediments de mesura i diferents laboratoris. Els sistemes de mesura generen resultats que són específics per un procediment de mesura i per un instrument determinat, per tant s'obtenen resultats diferents dels analits depenen del tipus d'assaig i dels equips utilitzats per el laboratori. Aquestes diferències impossibiliten desenvolupar intervals de referència comuns, i comporten confusió entre els metges alhora d'interpretar els valors dels resultats (11). Així doncs, l'estandardització en l'àrea del laboratori clínic té com a finalitat assolir un bon nivell de comparabilitat entre els resultats d'un determinat analit independentment del procediment de mesura, de l'equip i del laboratori on es realitza la mesura.

Per millorar l'estandardització al laboratori clínic es va crear el 2002, a través d'una aproximació internacional, el *Joint Committee on Traceability in Laboratory Medicine* (JCTLM) sota els auspicis de l'*International Bureau of Weights and Measures* (BIPM), la

IFCC i la ILAC. També van participar en aquest procés representants dels principals fabricants de la indústria del diagnòstic *in vitro* d'Europa, Japó i Estats Units, els productors de materials de referència, les organitzacions d'assegurament de la qualitat i d'acreditació, i els organismes reguladors de diferents països (12).

El principal objectiu del JTCLM és treballar per assolir la comparabilitat dels resultats de mesura al laboratori clínic seguint els principis bàsics de la metrologia. Les seves principals funcions són:

- promoció del concepte de traçabilitat metrological,
- establir una base de dades de materials de referència i de procediments de mesura de referència existents,
- establir una xarxa de laboratoris de referència,
- col·laborar en el desenvolupament de nous materials de referència i procediments de mesura de referència, i
- establir els processos per l'aprovació de nous materials de referència i procediments de mesura de referència.

Amb l'objectiu d'assolir la comparabilitat dels resultats analítics es van elaborar el 2003 les normes internacionals ISO 17511 (13) i ISO 18153 (14), que descriuen el concepte de "sistema de mesura de referència". El sistema de mesura de referència és una cadena de traçabilitat metrological on es descriu una seqüència de calibratges que relaciona un resultat d'una mesura amb una referència determinada. La seqüència de calibratge està constituïda per una jerarquia de procediments de mesura i de materials de calibratge, que es relacionen entre si per assegurar la traçabilitat metrological dels resultats obtinguts en les mostres dels pacients.

El nivell superior de la cadena és responsabilitat dels Instituts Nacionals de Metrologia, el BIPM, la Organització Mundial de la Salut (OMS), la IFCC, el *National Institute of Standards and Technology* (NIST), el *Institute for Reference Materials and Measurements* (IRMM) y altres organismes internacionals de normalització, juntament amb els laboratoris de referència acreditats. Aquest nivell consta dels següents elements (15):

- Definició del mesurand: l'especificació d'un mesurand requereix el nom de l'analit a mesurar, el tipus de magnitud i les unitats del SI, el sistema biològic i la descripció del procediment de mesura.
- Procediment de mesura de referència primari: es defineix, segons el VIM (5), com un procediment de mesura de referència emprat per obtenir un resultat de mesura sense relació amb un patró de mesura d'una magnitud de la mateixa naturalesa. Les seves funcions són l'avaluació de la veracitat de procediments de mesura d'una jerarquia inferior i la caracterització de nous materials de referència. Els valors de mesura obtinguts amb aquests procediments tenen la menor incertesa de mesura possible. Només poden ser proposats pels organismes internacionals citats anteriorment.
- Material de referència certificat: és una preparació que conté un analit amb una composició coneguda. S'acompanya d'un document que informa del valor de la magnitud assignat per un procediment de mesura de referència primari, juntament amb la seva incertesa de mesura associada (16). Aquests materials s'utilitzen amb els procediments de mesura de referència primaris, per preparar calibradors secundaris (patrons de mesura secundaris) amb valor assignat directament traçable a les unitats del SI. Organismes autoritzats com el NIST d'Estats Units o el IRMM d'Europa s'encarreguen de la seva preparació.

Del nivell intermedi del sistema de mesura de referència s'encarreguen els fabricants de la indústria del diagnòstic *in vitro*. Així doncs per regular-ho, el Parlament Europeu i el Consell de la Unió Europea van publicar la Directiva Europea 98/79/CE sobre "Productes sanitaris pel diagnòstic *in vitro*" (17). La directiva segueix els requisits de les normes ISO citades i és d'obligatori compliment per tots aquells fabricants que subministrin els seus productes als laboratoris clínics de la Unió Europea. Un dels requisits és que els fabricants han d'informar tant de la incertesa associada com de la traçabilitat metrològica dels valors assignats als seus calibradors i materials de control. Els principals elements d'aquest nivell són (15):

- Procediment de mesura de referència secundari: aquest procediment s'utilitza per avaluar la commutabilitat de calibradors de menor jerarquia, per assignar valor a calibradors interns dels fabricants del diagnòstic *in vitro* i per validar els procediments de mesura seleccionats pel fabricant.
- Calibrador secundari: el seu valor s'assigna amb un procediment de mesura de referència secundari calibrat amb un material de referència. S'utilitzen tant per calibrar els procediments de mesura elaborats pels fabricants del diagnòstic *in vitro*, com per assignar valor als seus calibradors interns o comercials.

Finalment, el nivell inferior de la cadena de traçabilitat metrological es responsabilitat dels laboratoris clínics. Els laboratoris clínics han d'assegurar la traçabilitat metrological dels procediments de mesura de rutina, ja sigui demanant la informació als fabricants o validant la traçabilitat dels procediments si aquests no són comercials. Als laboratoris clínics es mesuren les mostres dels pacients amb els procediments de mesura de rutina utilitzant un calibrador comercial amb valor assignat i traçable a les unitats del SI.

A la Figura 8 es mostra la cadena de traçabilitat d'un sistema de mesura de referència amb tots els elements explicats anteriorment (13). Els laboratoris de referència, mitjançant el procediment de mesura de referència i el material de referència, assignen valor a un segon material de referència o un calibrador secundari. Les empreses del diagnòstic *in vitro* utilitzen un patró intern com calibrador dels seus procediments de rutina per assignar valor al seu material calibrador comercial. Per últim, els laboratoris clínics mesuren les mostres dels pacients utilitzant els procediments de rutina calibrats amb els calibradors proporcionats pels fabricants. D'aquesta manera els resultats de les mostres dels pacients són traçables a les unitats del SI.

La cadena de traçabilitat d'un sistema de mesura de referència pot ser més o menys extensa segons quin sigui el número d'elements que la formen.

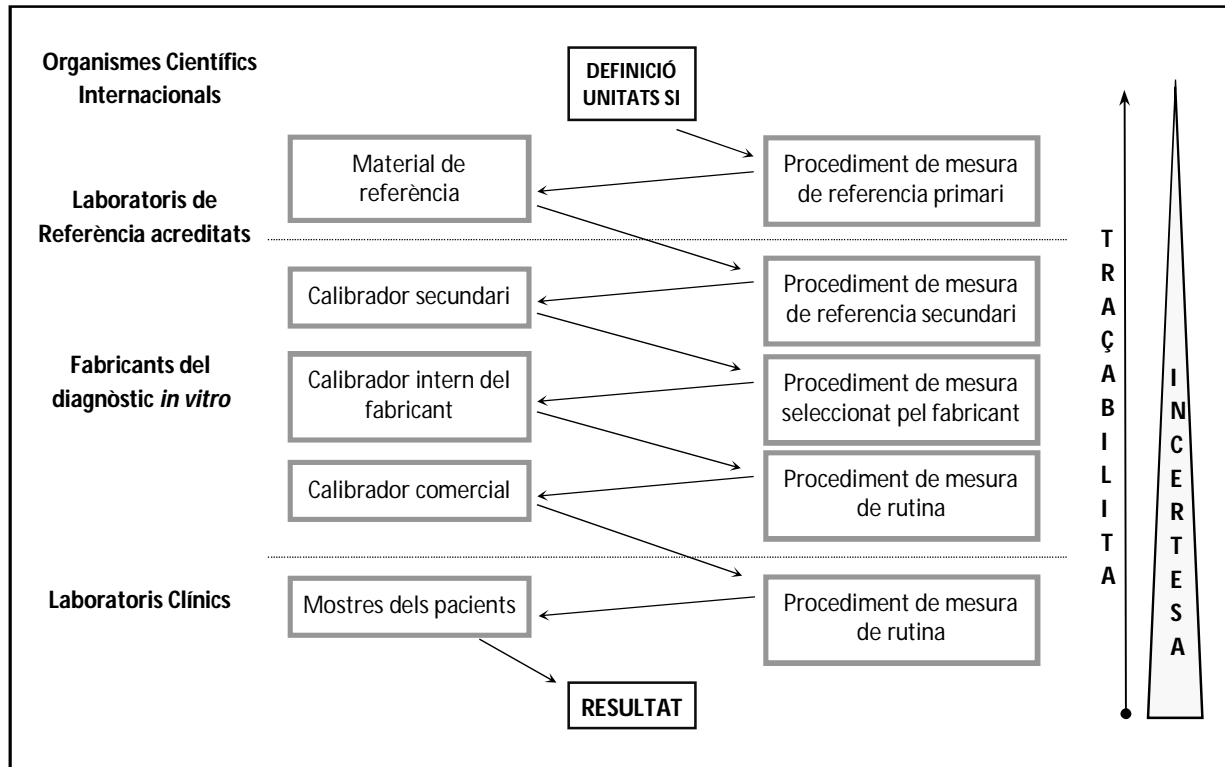


Figura 8. Esquema del sistema de mesura de referència (adaptada del document ISO 17511).

Una altra característica del sistema de mesura de referència és la incertesa associada a cadascun dels valors assignats als diferents calibradors. Com es pot veure representat, aquesta augmenta a mesura que es baixa de nivell a la cadena de traçabilitat metrological, ja que la incertesa del valor del calibrador anterior s'acumula a la incertesa produïda pel procediment de mesura utilitzat en l'assignació del valor actual.

S'ha de tenir en compte que no tots els analits que es mesuren en un laboratori clínic posseeixen tots els elements del sistema de mesura de referència. En aquest sentit es distingeixen dos tipus d'analits (10, 11):

- Analits de tipus A: són aquells analits ben definits. Les seves concentracions s'expressen en unitats del SI i els valors dels seus resultats no són mètode dependents. Posseeixen una cadena de traçabilitat completa.
- Analits de tipus B: són aquells analits heterogenis que no són traçables a les unitats del SI. No posseeixen una cadena de traçabilitat completa, ja que hi manquen les unitats del SI o el material de referència o el procediment de referència.

Per a que es pugui donar la traçabilitat dels resultats de les mostres dels pacients i per tant, la comparabilitat dels resultats analítics, s'han de complir dos requisits. El primer obliga a que els procediments de mesura de tota la cadena de traçabilitat tinguin la mateixa especificitat analítica (18). La selectivitat d'un sistema de mesura, denominació amb que el VIM (5) reconeix l'especificitat analítica, és la propietat d'un sistema de mesura per la que proporciona valors d'un mesurand que són independents d'altres mesurands de la mostra que s'investiga. És un requisit difícil d'assolir quan el mesurand presenta diferents formes moleculars en sèrum segons sigui la situació clínica del pacient. Cada forma molecular presenta unes característiques diferents que afavoreix en major o menor grau la seva reacció amb els procediments de mesura de la cadena de traçabilitat.

El segon requisit fa referència a la commutabilitat dels materials utilitzats com a calibradors (15, 18). La commutabilitat és una característica d'un material de referència o calibrador expressada per la concordança entre els resultats de mesura obtinguts per una magnitud determinada d'aquest material utilitzant dos procediments de mesura determinats, per una part, i la relació entre els resultats de les mostres de rutina, per l'altra (5). Dit amb altres paraules, la magnitud dels materials calibradors ha de comportar-se de la mateixa manera que la de les mostres dels pacients. D'aquesta manera, el calibratge corregeix els possibles errors sistemàtics existents entre els procediments de mesura, generant resultats comparables entre procediments diferents. Els calibradors existents al mercat no sempre compleixen aquesta propietat. Les possibles causes de la manca de commutabilitat venen atribuïdes als processos de purificació de les proteïnes, les tècniques recombinants utilitzades en la preparació dels materials, a l'origen no humà de l'analit, a la composició de formes moleculars, a l'origen de la matriu, a procediments físics, com la liofilització, i a l'addició d'estabilitzadors o conservants (19).

Per concloure, la utilització de diferents calibradors amb valors traçables al sistema de mesura de referència ha de permetre la comparabilitat de les mesures realitzades tant en un mateix laboratori al llarg del temps com les realitzades en diferents laboratoris.

1.2.1. Sistema de mesura de referència d'enzims

El sistema de mesura de referència d'enzims es descriu en la norma internacional ISO 18153 (14) específica per la traçabilitat metrològica de la concentració catalítica d'enzims.

Un mesurand es defineix per tres elements principals: el sistema biològic, l'analit i la magnitud. L'enzim és un analit que es mesura habitualment en plasma o en sèrum, però la seva magnitud pot ser la concentració de massa o la concentració catalítica. La concentració catalítica es defineix com la quantitat de mols de substrat que són transformats en producte per unitat de temps. Els resultats de les mesures dels enzims s'expressen en unitats (mol/s), que s'anomenen katal (kat), també s'expressen si es té en compte el volum com (kat/L). En conseqüència, els enzims definits per la conversió de substrat no pertanyen a les unitats SI, encara que la unitat katal ho suggereixi (20). Per altra banda, els resultats de les mesures de concentració catalítica només són comparables si l'activitat enzimàtica es mesura sota les mateixes condicions. Per tant, el mesurand enzimàtic no es pot descriure només amb els tres elements citats, també requereix de les condicions del procediment de mesura. Les principals condicions experimentals que afecten el valor de concentració catalítica són (14): la presència d'activadors de la reacció, el sistema tamponant i el pH, la temperatura de reacció, la concentració de substrat i el temps d'incubació. Així doncs, per exemple es defineix la concentració catalítica de creatina-cinasa en plasma o sèrum mesurada mitjançant la velocitat de conversió del NADH en el procediment de mesura de referència primari (21). És important destacar que la definició del mesurand enzimàtic, habitualment, inclou a una família d'analits degut a la presència d'isoenzims i de formes moleculars.

Els enzims són analits de tipus B ja que no posseeixen unitats del SI i són mètode dependents, però habitualment disposen d'un procediment de mesura de referència primari i d'un material de referència certificat.

A la Figura 9 es mostra la cadena de traçabilitat metrological del sistema de mesura de referència enzimàtic (14, 22). El mesurand es defineix amb les unitats de concentració catalítica ($\mu\text{kat/L}$). El procediment de mesura de referència primari, que descriu les condicions sota les que es mesura l'activitat d'un enzim determinat, es troba al nivell superior de la cadena de traçabilitat. S'utilitza directament per assignar valor a un calibrador intern. Es requereix d'un material de referència per transferir la veracitat dels valors del mesurand del procediment de referència al procediment de mesura seleccionat pel fabricant. Els laboratoris clínics, que utilitzen procediments de rutina i calibradors comercials validats per mesurar les mostres dels pacients, podran obtenir finalment valors traçables a les unitats ($\mu\text{kat/L}$) (definides pel procediment de mesura de referència primari).

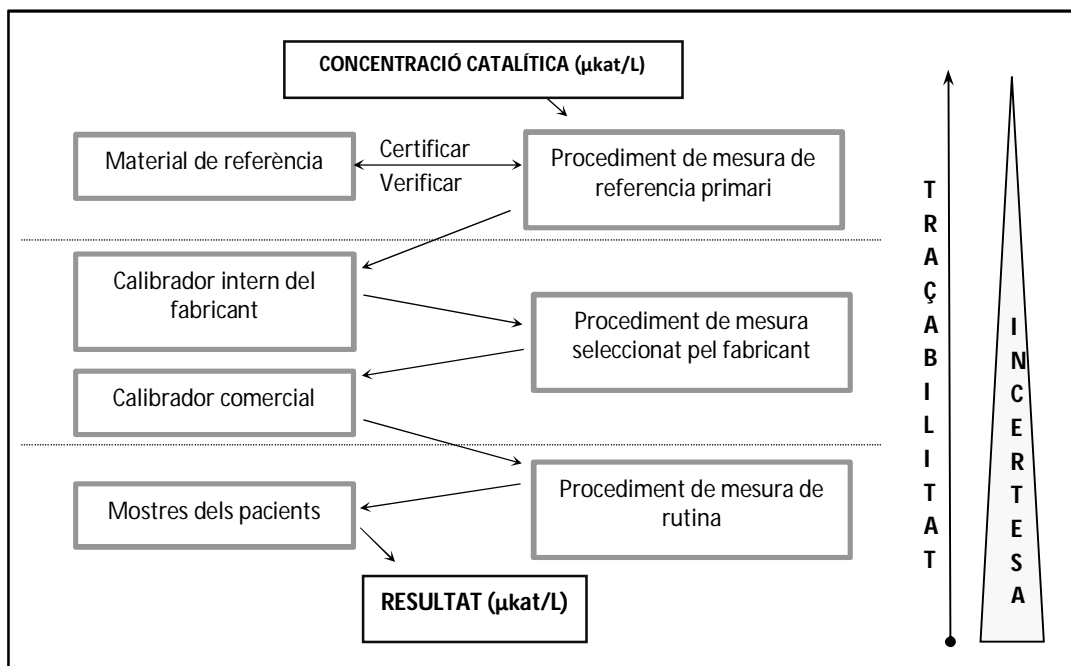


Figura 9. Sistema de mesura de referència dels enzims (simplificat) (adaptat de la ISO 18153).

L'aplicació del sistema de mesura de referència d'enzims només es possible si els materials calibradors són commutables (19, 22). La commutabilitat en enzimologia es defineix com l'habilitat d'un enzim d'un material (de referència o calibrador) de mostrar canvis similars en l'activitat catalítica en un assaig de comparació de dos procediments de mesura, als obtinguts per un mateix enzim de sèrum humà. Si no existeixen materials commutables, la única alternativa per establir la traçabilitat metrological és utilitzar un

panell de sèrums humans, amb valor assignat per un procediment de mesura de referència, com a material calibrador secundari (23).

L'estandardització en enzimologia mitjançant un sistema de mesura de referència requereix que els procediments de mesura comercials tinguin la mateixa especificitat analítica que els procediments de mesura de referència (19, 22). Per exemple, no es possible calibrar els procediments de mesura de les aminotransaminases que incorporen piridoxal fosfat, un activador enzimàtic, amb aquells procediments que no les incorporen.

Actualment, existeixen procediments de mesura de referència primaris descrits per la IFCC i materials de referència certificats per la IFCC i l'IRMM per a sis enzims: creatina cinasa (CK) (24), aspartat aminotransferasa (AST) (25), alanina aminotransferasa (ALT) (26), L-lactat deshidrogenasa (LD) (27), α -amilasa (AMI) (28) i γ -glutamilttransferasa (GGT) (29). Per la fosfatasa alcalina (FAL) només existeix el procediment de mesura de referència (30). El sistema de mesura de referència d'enzims s'ha aplicat amb èxit sempre que s'utilitzaven materials calibradors commutables obtenint-se valors de concentració catalítica per els procediments de rutina comparables als obtinguts amb el procediment de mesura de referència primari (31, 32, 33).

Per millorar l'estandardització enzimàtica es necessari realitzar més esforços per part de les diferents entitats que s'encarreguen dels tres nivells jeràrquics de la cadena de traçabilitat metrological. Les principals accions són (22):

- Definir nous procediments de mesura de referència i nous materials de referència.
- Implantar la traçabilitat per part de les empreses del diagnòstic *in vitro*.
- Prescindir de l'ús de procediments de mesura no específics per part de les empreses del diagnòstic *in vitro* i els laboratoris clínics.
- Utilitzar materials commutables amb valors traçables als programes d'avaluació externa de la qualitat.
- Establir límits màxims d'error permès per els valors de les mesures dels laboratoris clínics.

- Estimar la incertesa de mesura als laboratoris clínics, mitjançant els resultats del programa d'avaluació externa de la qualitat, per valorar l'exactitud dels valors obtinguts amb els procediments de mesura de concentració catalítica.

1.3. Laboratoris de Referència

Un laboratori per a ser considerat de referència ha de complir amb una sèrie de requisits (34): ha d'estar acreditat per les normes internacionals ISO 17025 (35) i ISO 15195 (36) (aquesta última és específica pels laboratoris de mesura de referència de l'àrea del laboratori clínic); ha d'utilitzar procediments de mesura de referència; i ha de demostrar la seva competència tècnica participant en un programa d'avaluació externa de la qualitat de laboratoris de referència. A més a més, la compliment dels requisits citats permet al laboratori de referència formar part de la xarxa de laboratoris de referència del JCTLM.

Un procediment de mesura de referència es defineix, segons el VIM (5), com un procediment de mesura que es considera que produeix resultats de mesura adients a l'ús que se'n preveu per a l'estimació de la veracitat dels valors mesurats obtinguts a partir d'altres procediments de mesura per magnituds de la mateixa naturalesa, per a un calibratge o per a la caracterització de materials de referència. Són procediments molt ben definits que requereixen d'instrumentació específica i de molta dedicació per ser utilitzats habitualment en els laboratoris de referència. Els procediments de mesura de referència es basen en diferents principis analítics, un dels més importants és l'espectrometria de massa de dilució isotòpica (IDMS), però també s'utilitzen l'espectrometria de flama, l'espectrometria d'absorció molecular i la cromatografia iònica.

El 2003, la IFCC i el *Reference Institute of Bioanalysis* (RfB) del *Deutsche Vereinte Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V* (DGKL) van posar en marxa un programa d'avaluació externa de la qualitat específic per els laboratoris de referència, que es coneix com RELA (37). Els resultats d'aquest programa són públics. No obstant això, els participants tenen la possibilitat de retirar els resultat del seu laboratori per mesurand participat un mes abans de mostrar l'informe definitiu a la pàgina web.

Després d'aquest temps, cada laboratori ha d'estar d'acord que els resultats i la identitat es donin a conèixer.

Les funcions dels laboratoris de referència són donar serveis de referència a la indústria del diagnòstic *in vitro*, als organismes internacionals de normalització, i als organitzadors de programes d'avaluació externa de la qualitat, però també als laboratoris clínics i a altres organitzacions sempre que ho necessitin. Els laboratoris de referència actuen d'enllaç entre els fabricants de la indústria del diagnòstic *in vitro* i els organismes de normalització.

1.3.1. Les normes ISO

Les normes ISO, desenvolupades per l'Organització Internacional de Normalització, són documents que estableixen els requisits, especificacions, directrius o característiques que poden ser utilitzats constantment per assegurar que els materials, productes, processos i serveis siguin aptes pel seu propòsit.

La norma ISO 17025:2005 "Requisits generals per a la competència dels laboratoris d'assaig i calibratge" (35), com el seu nom indica, descriu els requisits que han de complir els laboratoris d'assaig i calibratge si desitgen demostrar que posseeixen un sistema de gestió, són tècnicament competents i són capaços de generar resultats tècnicament vàlids.

Principalment, es defineixen uns requisits relatius a la gestió del laboratori i uns requisits tècnics. Els primers fan referència a la política i l'organització del laboratori, al control de la documentació, a les comandes i ofertes, als serveis als clients, al control d'assaigs no conformes, a les possibles millores que es poden desenvolupar, a les accions correctives i preventives, al control de registres, a les auditories internes i les revisions de la direcció. Els segons tracten del personal, de les instal·lacions i condicions ambientals, dels procediments d'assaig i calibratge, de la validació dels procediments, dels equips, de la traçabilitat de les mesures, del tractament de les mostres, de l'assegurament de la qualitat dels resultats i de l'informe de resultats. És important destacar que tota la informació s'ha de trobar ben descrita i documentada, ja que descriu pas a pas la manera com s'ha de treballar al laboratori.

La norma ISO 15195:2003 “Medicina del laboratori. Requisits per als laboratoris de referència” (36) s’aplica als laboratoris de referència de l’àrea del laboratori clínic. Com els requisits per la competència dels laboratoris d’assaig i calibratge s’especifiquen a la norma anterior, aquesta només fa referència als aspectes específics dels laboratoris de calibratge per la mesura de magnituds clíniques. Aquesta norma s’implanta conjuntament amb l’ISO 17025, essent aquesta última l’única acreditable.

1.3.2. El Laboratori de Referència d’Enzimologia Clínica

El treball que aquí es presenta s’ha realitzat al Laboratori de Referència d’Enzimologia Clínica (LREc) del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) creat a l’any 2005 (38). A la Figura 10 es mostra el seu logotip. El laboratori es va crear amb l’objectiu de col·laborar amb les organitzacions internacionals d’estandardització en el desenvolupament de nous procediments de mesura de referència i nous materials de referència per enzims en l’àmbit del laboratori clínic. El LREc està acreditat per la *Entidad Nacional de Acreditación* (ENAC) com laboratori d’assaig per la norma ISO 17025, l’11 d’abril del 2008, i com laboratori de referència per la norma ISO 15195, el 5 de març del 2010. A més a més, el laboratori forma part, des de gener del 2009, de la xarxa de laboratoris de referència del JCTLM, essent l’únic laboratori a Espanya que pertany a aquesta xarxa i un dels nou a nivell mundial que la constitueixen.



Figura 10. Logotip del Laboratori de Referència d’Enzimologia Clínica.

Aquestes normes proporcionen la competència al laboratori per la realització de diferents assaigs, per tant l’acreditació es dona per cadascun dels procediments de mesura que es realitzen al laboratori. Actualment, l’abast de l’acreditació del LREc inclou la mesura de la concentració catalítica de sis enzims mitjançant els procediments de mesura de referència primaris descrits pel *Committee on Reference Systems for Enzymes* (C-RSE) de la IFCC descrits a la Taula 1. Per cadascun dels enzims es mostra el seu rang de mesura i la incertesa dels valors de concentració catalítica, expressada en forma de Capacitat de Mesura i Calibratge (CMC), que és la mínima incertesa que el laboratori pot

informar als seus clients, expressada com incertesa expandida per un nivell de confiança d'aproximadament el 95 %.

Taula 1. Abast de l'acreditació del LREC. CMC = Capacitat de Mesura i Calibratge, expressada en forma d'incertesa expandida per un nivell de confiança d'aproximadament el 95 %.

MESURA	RANG	PROCEDIMENT	CMC
Concentració catalítica d'aspartat-aminotransferasa en sèrum sanguini	90 - 248 U/L (1,50 - 4,13 µkat/L)	<i>Espectrometria d'absorció molecular</i> Mètode de Referència Primari recomanat per la IFCC Clin Chem Lab Med 2002; 40(7):725-733	3,3 %
Concentració catalítica d'alanina-aminotransferasa en sèrum sanguini	40 - 200 U/L (0,67 - 3,33 µkat/L)	<i>Espectrometria d'absorció molecular</i> Mètode de Referència Primari recomanat per la IFCC Clin Chem Lab Med 2002;40(7):718-724	3,3 %
Concentració catalítica de creatina cinasa en sèrum sanguini	90 - 670 U/L (1,50 - 11,2 µkat/L)	<i>Espectrometria d'absorció molecular</i> Mètode de Referència Primari recomanat per la IFCC Clin Chem Lab Med 2002;40(6):635-642	3,3 %
Concentració catalítica d'L-lactat-deshidrogenasa en sèrum sanguini	90 - 500 U/L (1,50 - 8,33 µkat/L)	<i>Espectrometria d'absorció molecular</i> Mètode de Referència Primari recomanat per la IFCC Clin Chem Lab Med 2002;40(6):643-648	3,3 %
Concentració catalítica de γ-glutamilttransferasa en sèrum sanguini	15 - 250 U/L (0,25 - 4,17 µkat/L)	<i>Espectrometria d'absorció molecular</i> Mètode de Referència Primari recomanat per la IFCC Clin Chem Lab Med 2002;40(7):734-738	2,9 %
Concentració catalítica d'α-amilasa en sèrum sanguini	60 - 520 U/L (1,00 - 8,67 µkat/L)	<i>Espectrometria d'absorció molecular</i> Mètode de Referència Primari recomanat per la IFCC Clin Chem Lab Med 2006;44(9):1146-1155	3,5 %

Properament s'ampliarà l'abast a la mesura de l'enzim fosfatasa alcalina (FAL).

El laboratori proporciona els serveis següents (19):

- Desenvolupament, validació i assegurament de la transferibilitat dels procediments de mesura de referència primaris dels enzims, en cooperació amb els diferents comitès de la IFCC.
- Certificació de materials de referència enzimàtics, en cooperació amb l'IRMM.
- Validació de procediments de mesura i sistemes analítics comercials per la mesura en rutina de la concentració catalítica dels enzims inclosos a l'abast de l'acreditació.
- Assignació de valors traçables de concentració catalítica a calibradors interns de fabricants de la indústria del diagnòstic *in vitro*.
- Assignació de valors traçables de concentració catalítica als materials control dels programes nacionals o comercials d'avaluació externa o interna de la qualitat dels laboratoris clínics.

1.3.2.1. Assegurament de la qualitat dels resultats de mesura

Al laboratori es realitzen diverses activitats, que es troben programades a la seva rutina de treball, amb la finalitat de generar resultats exactes. Les activitats més destacades per mantenir la qualitat dels resultats de les mesures de concentració catalítica són:

- El registre de les existències de les matèries primeres i dels patrons interns, on s'especifica la referència i el lot del producte, la temperatura d'emmagatzematge, les dates d'arribada al laboratori i de caducitat i la quantitat de producte. Aquest, juntament amb el control diari de les condicions d'emmagatzematge, mantenen els productes en condicions favorables per la seva utilització.
- La formació constant del seu personal, mitjançant assaigs pràctics, i l'assistència a cursos i congressos nacionals i internacionals.

- El pla anual de manteniment, verificació i calibratge dels equips del laboratori per la seva correcta funcionalitat.
- Els calibratges realitzats als diferents equips mitjançant els patrons interns del LREC són traçables a patrons internacionals.
- El control intern de la veracitat dels resultats analítics, mitjançant la mesura del material de referència de cada enzim, per cadascun dels assaigs que es realitzen al laboratori.
- Les accions preventives i correctives realitzades anualment per millorar aspectes relacionats amb l'activitat del laboratori.
- La participació anual, per tots els enzims acreditats, en el programa de control extern de la qualitat RELA (37) específic pels laboratoris de referència. Proporcionen dos materials amb diferents concentracions per cadascun dels enzims. Per cada material s'informa d'un valor de concentració catalítica mitjà ($n = 9$), a partir dels resultats obtinguts de la realització de triplicats en 3 dies diferents, on s'utilitza un nou vial per dia.
- La declaració de la incertesa de mesura dels valors de concentració catalítica mesurats. L'estudi de la incertesa es basa en el coneixement del grau de contribució de cadascuna de les magnituds implicades (fonts d'incertesa) a la incertesa de mesura, per un procediment de mesura determinat. Aquest estudi s'anomena "compilació de la incertesa", definit pel VIM (5) com la formulació de la incertesa de mesura i dels components d'aquesta incertesa de mesura, així com llur càlcul i llur combinació. El concepte anterior també és coneix en nomenclatura anglosaxona com "uncertainty budget". La incertesa de mesura s'expressa en forma de CMC, és a dir, la mínima incertesa de mesura dels resultats analítics que el laboratori pot proporcionar als seus clients.
- El seguiment anual d'una auditoria interna de la qualitat realitzada per la Unitat de Garantia de la Qualitat (UGQ) de la UAB i d'una auditoria externa realitzada per ENAC.

2. OBJECTIUS

Els resultats de les mesures realitzades als laboratoris clínics han de ser alhora tan precisos com veraçs per poder fer un bon diagnòstic, pronòstic, tractament i monitoratge de les malalties. La importància de generar resultats exactes va comportar el desenvolupament i la implantació de l'estandardització en el laboratori clínic, basada en el concepte "sistema de mesura de referència". El sistema de mesura de referència és una cadena de traçabilitat metrological on es descriu una seqüència de calibratges que relacionen un resultat amb una referència determinada. Els laboratoris de referència tenen un paper essencial en els sistemes de mesura de referència. Un dels requisits que han de complir els laboratoris de referència, segons les normes internacionals ISO 17025 i ISO 15195, és conèixer la contribució de totes les fonts d'incertesa dels procediments de mesura de referència a la incertesa de mesura, el que s'anomena com "compilació de la incertesa". A més a més, el laboratori ha d'informar de la incertesa de mesura en forma de Capacitat de Mesura i Calibratge (CMC), que és la mínima incertesa de mesura dels resultats analítics que el laboratori pot informa als seus clients.

L'objectiu d'aquest treball, desenvolupat al Laboratori de Referència d'Enzimologia Clínica (LREC), és l'estimació de la incertesa de mesura dels procediments de mesura de referència primaris dels enzims descrits per la IFCC, mitjançant un estudi de compilació de la incertesa.

Per assolir l'objectiu es va plantejar utilitzar dos procediments acreditats del LREC com a models per l'estudi de la contribució de cadascuna de les fonts d'incertesa a la incertesa de mesura:

- *el procediment de referència primari per la mesura de l'enzim γ -glutamil transferasa (GGT), com a exemple de procediment amb una única reacció.*
- *el procediment de referència primari per la mesura de l'enzim creatina cinasa (CK), com a exemple de procediment amb més d'una reacció.*

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. Procediments de mesura de referència

- El procediment de mesura de referència primari de l'enzim γ -glutamilttransferasa (GGT) descrit per la IFCC (29) es troba documentat al PNT-005 del LREC. (Annex 1)
- El procediment de mesura de referència primari de l'enzim creatina cinasa descrit per la IFCC (24) es troba documentat al PNT-001 del LREC. (Annex 2)

3.1.1. Reactius

Els reactius utilitzats per preparar les solucions de treball per la mesura de la GGT i la CK es troben descrits al PNT-005 (Annex 1) i al PNT-001 (Annex 2), respectivament.

També es van utilitzar per l'estudi dels interferents de la GGT els reactius:

- Glicina: referència 16407 (USB).
- 5-Amino-2-nitrobenzoat: referència 330740010 (Acros Organics).

3.1.2. Equips

Balança analítica: model Handy H51 (Sartorius)

- Característiques:

Interval de mesura: 0,05 – 20 g .

Tara màxima: 10 g.

Resolució: 0,001 g.

- Requisits metrologicals:

Incertesa expandida (U) (k=2): $\leq 0,5 \%$

Error sistemàtic (ES): $\leq 0,5 \%$

- Calibratge: extern cada 12 mesos.

Verificació: interna cada dia que s'utilitza mitjançant una pesa patró calibrada.

- Patrons interns:

Pesa patró 1 g. No: 11119042 (Mettler Toledo).

Espectròmetre: model Uvikon 860 (Kontron)

- Característiques:

Components auxiliars: controlador de temperatura "peltier".

Interval de mesura: 180 a 900 nm, absorbàncies (A) -0,3 a 4,0.

Exactitud: longitud d'ona 0,50 nm, fotomètrica 0,004 (A = 1,0).

Precisió: longitud d'ona 0,02 nm, fotomètrica 0,002 (A = 1,0).

Altres: estabilitat > 0,0004 A/h (A = 0,0), amplada de banda 2 nm.

- Requisits metrològics:

Exactitud de la longitud d'ona: $\leq \pm 1$ nm.

Error màxim permès (ES + U): $\leq \pm 3$ % (A = 0,17), $\leq \pm 2$ % (A = 0,5), $\leq \pm 2$ % (A = 1,4), $\leq \pm 2$ % (A = 2,0).

Altres: estabilitat $\leq 0,01$ (A = 0,0 i A = 1,4), amplada de banda ≤ 2 nm, pas de llum ($10 \pm 0,01$) nm.

- Verificació: interna cada 12 mesos.

- Patrons interns:

Solució d'òxid d'holmi 1.08166.0001 (Merck).

Filtres patró neutres FNP-04, calibrats externament cada 5 anys.

ABTS A1888 (Sigma).

4-Nitrofenol 1.06798.0025 (Merck).

Pipeta automàtica: model Pipetman P-1000 (Gilson)

- Característiques:

Interval de mesura: 0,250 – 1,000 mL.

Resolució: 0,002 mL.

Exactitud: $\pm 1,50$ % (0,200 mL), $\pm 0,80$ % (0,500 mL, 1,000 mL).

Precisió: $\leq 0,30$ % (0,200 mL), $\leq 0,20$ % (0,500 mL), $\leq 0,15$ % (1,000 mL).

- Requisits metrològics:
Volums calibrats: 0,250 - 0,500 – 1,000 mL.
Requisits de la verificació: ES: $\leq 1,00\%$ i U (k = 2): $\leq 1,00\%$.
- Verificació per gravimetria: interna cada 3 mesos.

Pipeta automàtica: model Pipetman P-200 (Gilson)

- Característiques:
Interval de mesura: 0,050 – 0,200 mL.
Resolució: 0,001 mL.
Exactitud: $\pm 1,00\%$ (0,050 mL), $\pm 0,80\%$ (0,100 mL, 0,200 mL).
Precisió: $\leq 0,40\%$ (0,050 mL), $\leq 0,25\%$ (0,100 mL), $\leq 0,15\%$ (0,200 mL).
- Requisits metrològics:
Volums calibrats: 0,050 - 0,100 – 0,200 mL.
Requisits de la verificació: ES: $\leq 1,00\%$ i U (k = 2): $\leq 1,00\%$.
- Verificació per gravimetria: interna cada 3 mesos.

Pipeta automàtica: model Pipetman P-20 (Gilson)

- Característiques:
Interval de mesura: 0,005 – 0,020 mL.
Resolució: 0,0002 mL.
Exactitud: $\pm 5,00\%$ (2 μL), $\pm 2,00\%$ (5 μL), $\pm 1,00\%$ (10 i 20 μL).
Precisió: $\leq 1,50\%$ (2 μL), $\leq 0,80\%$ (0,5 μL), $\leq 0,50\%$ (10 μL), $\leq 0,30\%$ (20 μL).
- Requisits metrològics:
Volums calibrats: 0,005 - 0,010 – 0,020 mL.
Requisits de la verificació: (ES + U): $\leq 2,00\%$.
- Verificació per gravimetria: interna cada 3 mesos.

Termòmetre de sonda: model Eutechnics 4500 (Alpha Technics)

- Característiques:

Components auxiliars: sonda s/N 513317 SP 130.

Interval de mesura: -20 °C a +130 °C.

Resolució: 0,010 °C.

Exactitud: $\pm 0,025$ °C (rang de 0 a 100 °C).

Repetibilitat: $\pm 0,010$ °C (rang de 0 a 100 °C).

- Requisits metrològics:

Per la mesura de la temperatura de reacció: $(37,0 \pm 0,1)$ °C.

Requisits de calibratge: ES: $\pm 0,02$ °C i U (k = 2): $\pm 0,07$ °C a 37 °C.

- Calibratge: extern cada 12 mesos.

Termòmetre de vidre: model ASTM 5C/IP 1C

- Característiques:

Interval de mesura: -38 a +50 °C.

Resolució: 1 °C.

Incertesa: $\pm 0,5$ °C (segons certificat 510 DKD-K-06701 06 -3).

- Requisits metrològics:

Requisits de la verificació: desviació ± 2 °C a +20 °C i +37 °C.

- Verificació: interna cada 12 mesos.

- Patrons interns:

Termòmetre de sonda 51 k/j (Fluke).

pH-metre / Conductímetre: model Seven Multi S47 (Mettler Toledo)

- Característiques:

Components auxiliars: elèctrode pH In LabPro 9151607,
 cèl·lula conductivitat InLab 5809040512.

Interval de mesura: pH -2,000 a 19,999, conductivitat 0,001 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 1.000 mS/cm i temperatura -30 °C a 130 °C.

Resolució: pH 0,001, conductivitat 0,001 $\mu\text{S}/\text{cm}$ i temperatura 0,1 °C.

Incertesa: pH $\pm 0,002$, conductivitat $\pm 0,5 \%$ i temperatura $\pm 0,1$ °C.

Constant cèl·lula de conductivitat: 0,105972 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

- Requisits metrologicals:

Error màxim permès (ES + U): pH $\pm 0,03$, conductivitat $\pm 5,0 \%$ i temperatura $\pm 0,5$ °C a 25 °C.

- Calibratge: intern cada vegada que s'utilitza.

Verificació: interna cada vegada que s'utilitza.

- Patrons interns:

Solució tampó certificada de pH 4,01 a 25 °C, 94 60 (Crison).

Solució tampó certificada de pH 7,00 a 25 °C, 94 61 (Crison).

Solució tampó certificada de pH 11,00 a 25 °C, 51350012 (Mettler Toledo).

Solució tampó certificada de pH 7,41 a 25 °C, 107205 (Merck).

Solució de conductivitat certificada 1,30 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25°C, 238973 (Hamilton).

Bany d'aigua circulant amb termostatació: model 2219 Multi Temp II (LKB)

- Característiques:

Interval de temperatures: -10 – 90 °C.

Constància de temperatura: $\leq \pm 0,1$ °C (a temperatura ambient 20 °C).

- Ús: temperar les solucions de treball a 37 °C per ajustar el pH i a 20 °C per arrasar els matraus.

3.1.3. Mostres

- Per l'estimació de la incertesa de mesura del procediment de mesura de l'enzim GGT es van utilitzar les mostres:
 - Sèrum control bioquímica humana nivell II (SCH II) lot: 010 A (BioSystems).
 - Sèrum control bioquímica bovina nivells I i II (SCB I, SCB II) lots: 057A i 056A (BioSystems).
 - Sèrum del programa extern de qualitat RELA B 2009 (DGKL).
 - Material de referència de GGT ERM-AD452/IFCC (IRMM).
- Per l'estimació de la incertesa de mesura del procediment de mesura de l'enzim CK es van utilitzar les mostres:
 - Sèrum control bioquímica humana nivell II (SCH II) lot: 011AC (BioSystems).
 - Sèrum control bioquímica bovina nivell II (SCB II) lot: 055AE (BioSystems).
 - Sèrum "Liquid assayed multiquant" nivell 2 (LAM) lot: 45622 (Bio-Rad).
 - Sèrum control "Lyphocheck assayed" nivells 1 i 2 (LAC 1 i LAC 2) lots: 14401 i 14402 (Bio-Rad).
 - Calibrador CFAS lot: 158687 (Roche).
 - Calibrador A plus (Wiener).
 - Sèrum del programa extern de qualitat de la SEQC nivell 2 (Randox).
 - Sèrum del programa extern de qualitat RELA B 2011 (DGKL).
 - Material de referència de CK ERM-AD455/IFCC (IRMM).
 - Sèrums humans del laboratori de l'ambulatori de Bon Pastor (Barcelona).

3.1.3.1. Processament de les mostres

Les mostres es van processar segons la seva presentació:

- Líquides congelades, es van descongelar incubant-les en un bany d'aigua a temperatura ambient durant uns 15 minuts, deixant el tap del vial per sobre el nivell de l'aigua. Després s'assecava la superfície i s'agitava la mostra

suaument en un vòrtex durant uns 20 segons. Les mostres es van mantenir a 4 °C fins el seu ús.

- Liofilitzades, conservades a -20 °C, es van deixar temperar durant uns minuts a temperatura ambient. Després d'assegurar que tot el liofilitzat es trobava a la part inferior del recipient, es va destapar i es va pesar el vial de cada mostra. Es va tarar la balança, es va reconstituir el liofilitzat amb la quantitat d'aigua destil·lada indicada a l'etiqueta del vial. Es va utilitzar aigua destil·lada a una temperatura de 20 ± 1 °C. Posteriorment, es va anotar el pes de la reconstitució. Finalment, es va tancar el vial de cada mostra i es va invertir varies vegades, sense sacsejar-lo, per tal de dissoldre el liofilitzat. Es va deixar al voltant d'1 hora a temperatura ambient, i es va invertir dues vegades més (als 20 i als 30 minuts). Les mostres reconstituïdes es mantenien a 4 °C fins el seu ús.

Abans de processar les mostres es deixaven temperar a temperatura ambient i després de les mesures es guardaven a 4 °C.

3.2. Estimació de la incertesa de mesura

Actualment, existeixen diferents recomanacions, sense que una invalidi a l'altra, per realitzar una estimació de la incertesa de mesura. S'han utilitzat els documents: "*Evaluation of measurement data- Guide to the expression of uncertainty in measurement*" (39), més conegut com GUM i desenvolupat pel *Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM)*, i "*Quantifying uncertainty in analytical measurement*" (40), recomanat per l'*Eurachem*, com a referència per desenvolupar l'estudi presentat en aquest treball. El primer document té una aplicació general segons quin sigui el camp temàtic de les mesures. Per altra banda, el segon document presenta un enfocament més específic en el camp de l'anàlisi química, tot i això, descriu la estimació de la incertesa d'una manera senzilla i presenta aplicacions útils per l'estimació de la incertesa de mesura de la concentració catalítica. El procediment seguit per estimar la incertesa de mesura es resumeix en els següents passos:

- *Definició del mesurand*: on s'especifica una descripció completa del que es mesura.
- *Identificació de les fonts d'incertesa*: on es realitza un llistat amb totes les possibles causes (fonts) que generen incertesa de mesura.
- *Estimació de la incertesa estàndard*: on es quantifica la contribució de cada font a la incertesa de mesura.
- *Estimació de la incertesa combinada*: on es combinen les incerteses estàndards estimades per cadascuna de les fonts identificades.
- *Estimació de la incertesa expandida*: on s'expressa la incertesa combinada multiplicada per un factor de cobertura amb una determinada probabilitat.

3.2.1. Definició del mesurand

Per estimar la incertesa de mesura primer de tot, s'ha de conèixer molt bé el mesurand. El VIM (5) defineix mesurand com la magnitud que es vol mesurar. Això és senzill per aquells components que estan químicament ben caracteritzats, com per exemple l'ió sodi o la urea, però pot ser més difícil quan la magnitud mesurada depèn del mètode, com per exemple la concentració catalítica d'un enzim. En aquest cas la definició del mesurand ha d'incloure suficients detalls (40, 41). Així doncs, s'elabora una descripció completa i exhaustiva del mesurand on s'especifica:

- El nom del component (analit) analitzat. Si presenta isoformes o formes moleculars s'ha d'indicar quina o quines d'elles es mesuren. Per exemple, l'enzim CK presenta tres isoenzims diferents, CK-MM, CK-MB i CK-BB.
- El tipus de magnitud, per exemple la concentració de massa o concentració catalítica.
- Les unitats de mesura, per exemple $\mu\text{g/L}$, U/L o $\mu\text{kat/L}$.
- El sistema biològic on es mesura el component. Per exemple, sang, sèrum, plasma (indicar els anticoagulants per possibles interferències amb el procediment de mesura), orina.

- La metodologia del procediment de mesura, pot ser per immunoanàlisi, espectrometria d'absorció molecular, dispersió molecular. Si la magnitud mesurada és dependent d'alguna de les condicions de mesura descrites al procediment, com per exemple el pH, la temperatura, també s'han d'especificar. És habitual incloure la citació del procediment de mesura utilitzat a la definició del mesurand.

3.2.2. Identificació de les fonts d'incertesa

Per font d'incertesa s'entén qualsevol factor que produeixi variabilitat en el resultat de mesura d'una magnitud. Aquestes fonts de variabilitat estan íntimament lligades al procés de mesura de l'analit. Per tant, s'identifiquen a partir dels coneixements proporcionats tant per la definició del mesurand com pel procediment de mesura. Alguns exemples genèrics són (40, 42):

- El tractament de les mostres.
- La preparació de reactius.
- La preparació de materials de control i de calibratge.
- Les característiques dels instruments de mesura.
- Les condicions de mesura.
- Els interferents del procediment de mesura.
- El calibratge.
- Les correccions d'errors sistemàtics.
- El blanc de reactiu.
- Els efectes aleatoris.

L'objectiu principal d'aquest punt és identificar totes les causes que generen incertesa de mesura d'una manera clara i ordenada, ja que únicament aquestes seran les que posteriorment es valoraran. Per obtenir una correcta estimació de la incertesa de mesura és important no obviar ni tractar dues vegades la mateixa font d'incertesa. Per realitzar una bona anàlisi de les fonts d'incertesa s'utilitzen les representacions de causa i efecte o d'espina de peix, anomenada així per la seva morfologia (43).

El diagrama de causa i efecte és una eina per analitzar detalladament i presentar les relacions entre un efecte donat (per exemple, variacions en els valors de concentració catalítica de CK) i les seves possibles causes. Les causes potencials són les possibles fonts d'incertesa trobades. Aquestes s'organitzen en categories i subcategories en el diagrama. El primer pas per preparar un diagrama és definir l'efecte, és a dir, la incertesa associada als valors del mesurand. La magnitud del mesurand es representa com una línia recta horitzontal. El segon pas consisteix a definir les principals categories de les possibles fonts d'incertesa. Una manera possible és relacionar la categoria amb l'origen de les causes d'incertesa, per exemple les condicions de mesura o el tractament de les mostres. Aquestes es representen per unes altres línies (branques o costelles) obliqües tant a sobre com a sota de la línia principal. Finalment, de cada branca surten unes altres més petites per indicar cada font individual. Així doncs, dintre de la categoria condicions de mesura es poden trobar, per exemple la temperatura, el pH, el temps de lectura, etc. La Figura 11 representa el diagrama del procés descrit anteriorment. És una interpretació molt visual que ajuda a organitzar les diferents causes d'incertesa i a detectar possibles duplicitats.

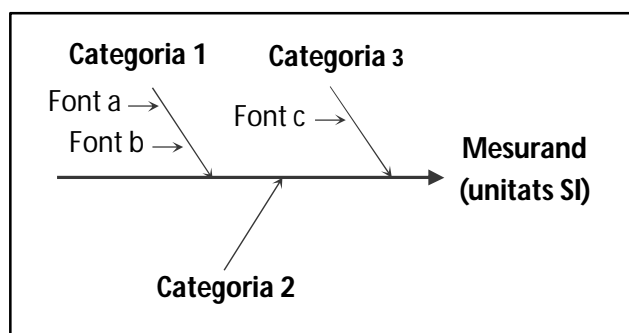


Figura 11. Diagrama de causa i efecte.

També es poden representar les fonts d'incertesa a partir d'una funció, on la variable dependent (y) és igual a la magnitud del mesurand, i les variables independents (x_1) a (x_n) són les diferents fonts d'incertesa de les quals depèn el mesurand: $y = f(x_1, x_2, \dots, x_n)$. S'ha de tenir en compte que les diferents fonts d'incertesa també poden representar altres mesurands els quals, a la vegada, poden dependre d'altres factors. Aquesta funció es basa, en principi, en la fórmula del càlcul de la magnitud del mesurand que, com normalment és una definició incompleta del

mesurand, s'ha d'afegir posteriorment la resta de variables independents. La quantitat de fonts pot fer impossible trobar una funció on es trobin relacionades totes les variables independents, per tant, la funció pot ser útil només per aquells casos senzills on s'estudiï un petit número de fonts d'incertesa (39, 44).

En resum, primer s'identifiquen totes les causes que produeixen variabilitat en el mesurand. Segon, s'ordenen per grups i s'esquematitzen. Després, es revisen per si s'ha de descartar alguna font que s'ha tingut en compte més d'una vegada o per si s'ha d'afegir alguna font que havia passat desapercibuda. Finalment, s'obtenen totes les fonts per ser estudiades, que no significa que totes contribueixin a la incertesa de mesura (40).

3.2.3. Estimació de la incertesa estàndard

La incertesa estàndard, com el seu nom indica, és aquella incertesa expressada en forma de desviació estàndard. Per tant, no deixa de ser un indicador de dispersió (45), que descriu el grau de distanciament que presenten els valors d'una magnitud en la seva distribució respecte a la mitjana aritmètica.

L'estimació de la incertesa de mesura es pot realitzar de les següents maneres (46):

- per una aproximació "*Bottom up*", on s'avalua i es quantifica la incertesa estàndard individualment per cadascuna de les fonts, les quals, després, es combinaran per obtenir la incertesa de mesura,
- per una aproximació "*Top down*", on es determina directament la incertesa estàndard d'un o de més grups de varies fonts d'incertesa relacionades entre si, a partir de les dades obtingudes en la validació del procediment de mesura.

En aquest estudi s'ha seguit la primera aproximació, on es realitza una avaluació molt més exhaustiva dels components, possibles fonts d'incertesa, del procediment de mesura. Això permet tenir un bon coneixement del procediment, i adonar-se dels punts febles que poden ser millorats. Però, com a vegades és impossible trobar la informació necessària d'algunes de les fonts d'incertesa, es treballa segons la segona aproximació. Així doncs, és habitual la combinació de totes dues. A la Taula 2 es mostren els avantatges i els inconvenients de les dues aproximacions.

Taula 2. Avantatges i inconvenients de les aproximacions "Bottom up" i "Top down" per l'estimació de la incertesa.

	BOTTOM-UP	TOP-DOWN
Avantatges	Millora el coneixement del procediment de mesura	Fàcil d'implementar
	Identifica etapes crítiques en el procediment de mesura	Fàcil de tenir en compte tots els factors d'incertesa
Inconvenients	Elevat temps i esforç	Risc de no identificar els factors més importants
	Dificultat d'identificar i quantificar totes les fonts d'incertesa	No dona informació per millorar el procediment

Les incerteses estàndards de les fonts d'incertesa estudiades es classifiquen en dos grups, de tipus A o de tipus B, segons la manera de quantificar-les (39, 40). Les de tipus A són totes aquelles que s'han estimat a partir d'una anàlisi estadística dels valors mesurats obtinguts en condicions definides de mesura, i les de tipus B a partir d'altres mitjans que no siguin per la via anterior. Els mitjans poden ser a partir de dades publicades i reconegudes, per certificats de calibratge o per altres fonts. La classificació no indica cap diferència en la naturalesa del valor de la incertesa estàndard estimada, ja que totes dues avaluacions es basen en distribucions de probabilitat que es descriuen pels indicadors de dispersió, la variància o la desviació estàndard.

3.2.3.1. Distribucions de freqüències

Els valors que pren una determinada magnitud, al ser mesurada repetides vegades, segueixen una determinada distribució de freqüències. Les distribucions més habituals són (47, 48):

- ***Distribució normal o gaussiana:***

Aquesta distribució (Figura 12) es caracteritza per ser simètrica respecte la mitjana (μ), per la coincidència de la mitjana, la mediana i la moda, i per la coincidència dels punts d'inflexió de la gràfica amb els valors $(\mu - s)$ i $(\mu + s)$ (on s equival a la desviació estàndard). Els següents intervals prenen una determinada proporció de les dades de la distribució:

- $[\mu - s, \mu + s]$ determinen el 68,26 % de les dades.
- $[\mu - 2s, \mu + 2s]$ determinen el 95,44 % de les dades.
- $[\mu - 3s, \mu + 3s]$ determinen el 99,74 % de les dades.

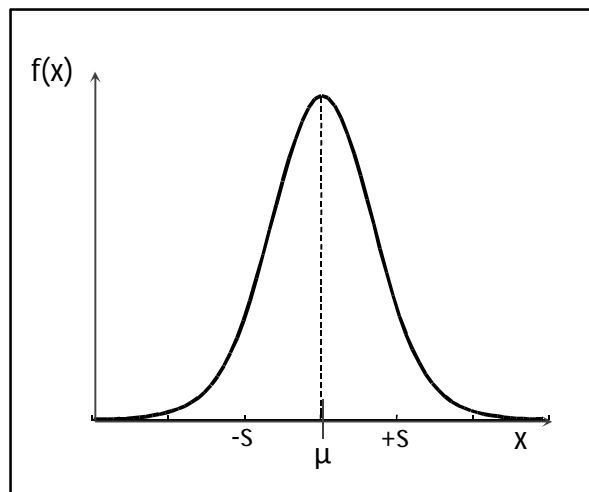


Figura 12. Distribució normal.

Es representa el valor de la mitjana (μ) i els valors $(\mu \pm s)$, on (s) és la desviació estàndard.

- ***Distribució rectangular o uniforme:***

Aquesta distribució (Figura 13) es caracteritza per la mateixa probabilitat que posseeixen tots els valors de la magnitud que es troben en un interval entre (a) i (b).

L'interval depèn només de la longitud del mateix, però mai de la seva posició. La desviació estàndard (s) es calcula:

$$s = \frac{b-a}{\sqrt{12}} = \frac{\mu-a}{\sqrt{3}} = \frac{b-\mu}{\sqrt{3}}$$

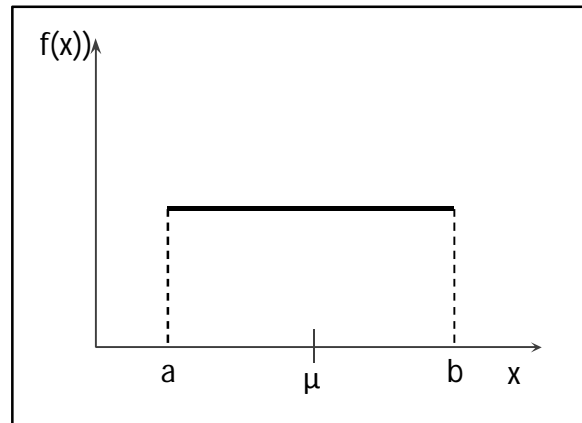


Figura 13. Distribució rectangular.

Es representa el valor de la mitjana (μ) i els valors de la magnitud (a) i (b).

- ***Distribució triangular isòsceles:***

Aquesta distribució (Figura 14) es caracteritza per una major freqüència d'obtenir el valor de la magnitud que correspon a la mitjana, que els valors extrems de l'interval (a , b). La desviació estàndard (s) es calcula:

$$s = \frac{b-a}{\sqrt{24}} = \frac{\mu-a}{\sqrt{6}} = \frac{b-\mu}{\sqrt{6}}$$

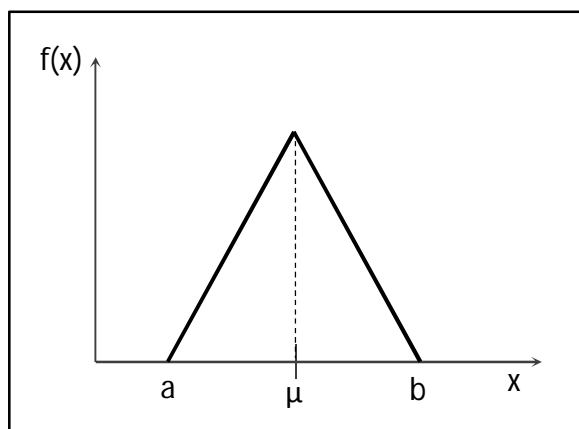


Figura 14. Distribució triangular isòsceles.

Es representa el valor de la mitjana (μ) i els valors de la magnitud (a) i (b).

- **Distribució triangular rectangle:**

Aquesta distribució (Figura 15) es caracteritza perquè en un dels extrems de l'interval de valors de la magnitud (a) es dona la freqüència màxima i en l'altre extrem (b) la mínima. La desviació estàndard (s) es calcula:

$$s = \frac{b - a}{\sqrt{18}}$$

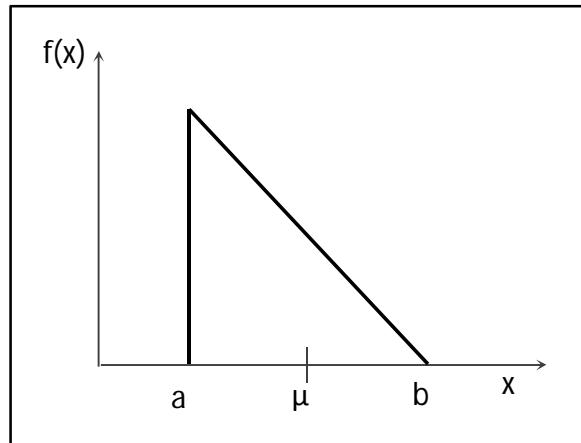


Figura 15. Distribució triangular rectangle. Es representa el valor de la mitjana (μ) i els valors de la magnitud (a) i (b).

3.2.3.2. Incertesa estàndard de tipus A

La incertesa estàndard de tipus A s'estima a partir d'una anàlisi estadística de les dades obtingudes en condicions experimentals (39). Per cada magnitud estudiada, i sempre que sigui possible, es realitzen (n) mesures independents. Els (n) valors, tot i ser de mesures repetides, difereixen entre ells degut a l'existència d'efectes aleatoris. Així el número de les (n) mesures ha de ser suficientment gran per obtenir una bona representació de la funció de distribució de freqüències dels valors de la magnitud. D'aquesta manera s'assegura una estimació exacta tant del valor de la magnitud, com de la seva desviació. Es calcula la mitjana (\bar{X}) per obtenir el valor de la magnitud, on x_j són cadascun dels valors de les (n) mesures (45, 49):

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \times \sum_{j=1}^n x_j$$

Per quantificar la dispersió dels valors de la magnitud es calcula la variància (s^2) i la desviació estàndard (s):

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \times \sum_{j=1}^n (x_j - X)$$

$$s = \sqrt{s^2}$$

Es recomana (39) utilitzar l'error estàndard de la mitjana per estimar la incertesa estàndard (u_s), i quan sigui possible fer servir un (s/\sqrt{n}) mitjà de diferents experiments:

$$u_s = \sqrt{\frac{s^2}{n}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

També es pot utilitzar el coeficient de variació (CV) com estimador de la incertesa estàndard quan es volen expressar els resultats en % (on la s es pot expressar com l'error estàndard de la mitjana)):

$$CV = \frac{s}{X} * 100$$

Per estimar la incertesa és important tenir en compte quin és el comportament de la variància o la desviació estàndard segons el valor de la concentració del mesurand. Aquest comportament es coneix realitzant els perfils de precisió, els quals són utilitzats per estudiar algunes de les característiques d'un procediment de mesura. Un perfil de precisió és una representació gràfica de la variància, la desviació estàndard o el coeficient de variació, obtinguts en condicions experimentals, pels diferents valors que pren la magnitud. A la Figura 16 s'observa com varia la variància segons el valor de la magnitud en dos procediments de mesura (A i B) diferents. En el procediment A s'observa el fenomen anomenat heteroscedasticitat, definit com la propietat per la qual la variància metrològica es depenen del valor del mesurand. Per altra banda, en el procediment B la variància és constant per qualsevol valor que prengui el mesurand, és la propietat anomenada homoscedasticitat (50, 51).

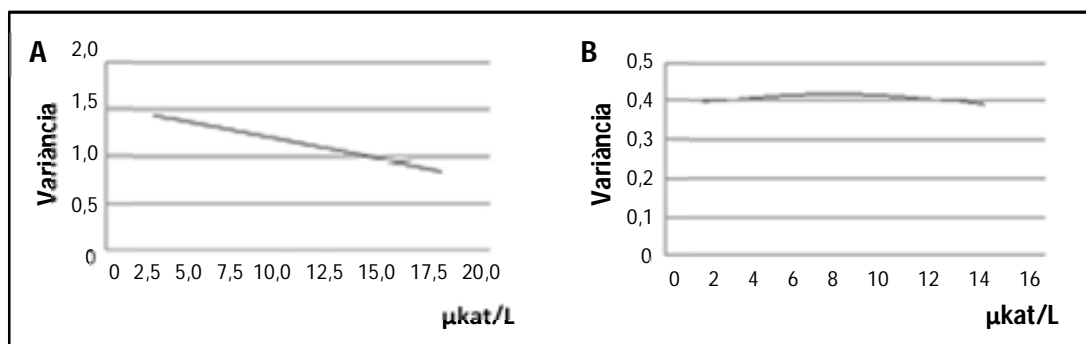


Figura 16. Perfils de precisió de dos procediments de mesura. En el procediment A s'observa el fenomen de la heteroscedasticitat i en el procediment B el de l'homoscedasticitat.

És important tenir en compte que quan el coeficient de variació es manté constant per tots els valors que pren el mesurand no es parla d'homoscedasticitat, ja que a cada valor del mesurand li correspon una desviació estàndard diferent. Per tant, quan existeixi heteroscedasticitat la incertesa serà diferent per cada valor del mesurand. S'ha d'utilitzar el valor de la desviació estàndard que correspon amb el valor del mesurand per estimar la seva incertesa associada. La incertesa serà la mateixa per tots els valors del mesurand en aquelles situacions on existeixi heteroscedasticitat, on els coeficients de variació siguin constants, i s'expressi la incertesa de mesura en %.

3.2.3.3. Incertesa estàndard de tipus B

La incertesa estàndard de tipus B s'estima a partir de qualsevol altre via que no sigui l'explicada anteriorment. En aquest cas, es busca informació disponible sobre la possible variabilitat de la font d'incertesa estudiada. Posteriorment, la informació es valora amb coneixement científic per estimar la incertesa a partir d'una funció de distribució de freqüències establerta (39). Aquesta informació es pot trobar a:

- certificats de calibratge i altres;
- especificacions dels proveïdors;
- la pròpia experiència i coneixements del laboratori; i
- valors publicats i reconeguts.

A continuació es mostren alguns exemples per estimar la incertesa estàndard de tipus B segons la informació disponible (40):

- Incertesa de mesura (U) per un determinat valor R ($R \pm U$) d'un certificat de calibratge. Dona informació del factor de cobertura (k), ja sigui indicant el propi valor del factor o el nivell de confiança utilitzat juntament amb els graus de llibertat (el que permetrà trobar el factor de cobertura a partir de les taules de la distribució indicada). El factor de cobertura correspon a un múltiple de la desviació estàndard, per tant la incertesa estàndard s'obté a partir $u_s = U/k$.
- Incertesa de mesura d'un certificat o especificacions del fabricant en forma d'interval ($R \pm U$), que no especifiquin el factor de cobertura. Segons la magnitud en estudi se li assigna una distribució de freqüència determinada i s'obindrà la desviació estàndard com s'ha explicat a l'apartat 3.2.3.1.

3.2.4. Estimació de la incertesa combinada

Una vegada quantificades totes les incerteses estàndard de cadascun dels factors, es combinen entre elles per donar la incertesa combinada del mesurand a partir de l'anomenada llei de la propagació d'incertesa.

La propagació d'incertesa és l'efecte acumulatiu de les incerteses de cada variable independent que es propaguen a la incertesa de la variable dependent d'una funció matemàtica. La combinació d'incerteses es desenvolupa a partir del concepte matemàtic sèrie de Taylor d'una funció $y = f(x_1, x_2, \dots, x_n)$.

Matemàticament, una sèrie de Taylor d'una funció $f(x)$ infinitament derivable es defineix com (52):

$$f(x) = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{f^{(n)}(a)}{n!} (x - a)^n$$

On $(n!)$ és el factorial de (n) i $f^{(n)}(a)$ indica la n-èsima derivada de f en el punt (a) .

Per obtenir la incertesa combinada s'aplica la sèrie de Taylor de primer ordre a la funció del mesurand en estudi:

$$y = f(x_1 + \delta x_1, \dots, x_n + \delta x_n) = f(x_1, \dots, x_n) + \frac{\partial f}{\partial x_1} \delta x_1 + \dots + \frac{\partial f}{\partial x_n} \delta x_n$$

On $(\partial f/\partial x_i)$ representa els coeficients de sensibilitat i (δx_i) són les desviacions del valor estimat per cadascuna de les variables independents, les quals són comparables a la mida de les incerteses estàndard $(u_s(x_i))$ respectives. La incertesa estàndard combinada (u_c) s'obté a partir de:

$$u_c^2(y) = \sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \right)^2 u_s^2(x_i)$$

L'expressió de la incertesa combinada variarà segons si les variables independents (x_i) es troben relacionades o no entre elles.

3.2.4.1. Coeficients de sensibilitat

Els coeficients de sensibilitat expressen el grau en que es veu afectat el mesurand per canvis produïts en el valor de cadascuna de les fonts d'incertesa (39). És a dir, com variarà el valor de la variable dependent (y) si es modifica el valor de la variable independent (x). Es poden donar per petits canvis de (x) tant variacions molt grans com petites de (y).

Per cada font d'incertesa es defineix un coeficient de sensibilitat, el qual pren valors de números reals positius, on s'inclou el 0. El valor 0 indica que no hi ha cap influència entre la font d'incertesa i el mesurand, així doncs, la font d'incertesa quedaria descartada com a tal. El valor 1 expressa variacions directament proporcionals de la font d'incertesa amb el mesurand. Per exemple, si es modifica un 10 % el valor de la font d'incertesa, ja que aquesta és la seva incertesa estàndard declarada, el resultat del mesurand es veurà afectat també en un 10 %. També s'assignen valors d'1 quan la incertesa estàndard de la font estudiada s'expressa directament com l'efecte produït en el mesurand (o la variable y) (40).

Els coeficients de sensibilitat de les fonts d'incertesa, sempre que es possible, s'obtenen experimentalment. L'estudi consisteix en (53): a) Obtenir de 3 a 5 valor diferents de la magnitud (condicions) de la font d'incertesa, per exemple preparar 5 reactius amb pHs diferents. L'increment entre els diferents valors de la magnitud dependrà del valor de la seva incertesa. b) Mesurar per triplicat o quadruplicat el mesurand d'una mostra determinada per cadascuna de les condicions de la font d'incertesa. És a dir, es mesura la concentració catalítica amb cadascun dels 5 reactius amb pH diferent. c) Les dades (valors mitjans dels replicats del mesurand) es representen en una gràfica on es mostra la variable depenen, el mesurand, en unitats de %, respecte les diferents variacions del valor de la font d'incertesa. Per les relacions lineals es calcula la funció de la recta de regressió, on el pendent de la recta simbolitza el valor del coeficient de sensibilitat (hi ha una millor correlació de les dades amb un major número de condicions).

Les condicions per realitzar els experiments del coeficient de sensibilitat en aquest estudi han estat:

- L'ús d'un sèrum control comercial (mateix lot) com a mostra per la mesura i comparació dels valors del mesurand. És va utilitzar el sèrum SCH II pels dos enzims.
- L'ús, sempre que va ser possible, del mateix vial de sèrum control per l'estudi del coeficient de sensibilitat d'un factor d'incertesa.
- El seguiment de les condicions descrites en el procediment de mesura de referència dels enzims GGT i CK per l'estudi de cada font d'incertesa.
- Els triplicats o quadruplicats realitzats per cada condició de mesura s'accepten quan el seu CV es troba dins del requisit establert pel LREC, per l'enzim GGT el $CV \leq 1,5 \%$ i per la CK $\leq 2,0 \%$.
- Les dades representades en els gràfics provenen de la mitjana dels triplicats o quadruplicats realitzats en cada condició de mesura.
- Per cada font d'incertesa estudiada el valor 100 % de la concentració catalítica representat gràficament, correspon a la condició descrita en el procediment de mesura de referència.

- Les mitjanes es comparen mitjançant una anàlisi de la variància d'un factor (ANOVA) (54) per un nivell de significació $\alpha = 0,05$ i utilitzant un contrast post-hoc de *Scheffé*, per veure si són o no significativament diferents entre elles. S'han utilitzat els programes informàtics *Microsoft Excel 2010* i *IBM SPSS Statistics v 19*.
- El coeficient de sensibilitat representat per la pendent de la recta de regressió s'accepta quan el coeficient de correlació $R^2 \geq 0,9506$ (55).

3.2.4.2. Fonts d'incertesa independents

En els casos on les fonts d'incertesa, de les qual depèn el mesurand, no es trobin relacionades entre elles, la incertesa combinada s'obtindrà a partir de la fórmula anterior que és simplificarà a l'expressió (39):

$$u_c^2(y) = \sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \right)^2 u_s^2(x_i) \quad \text{es transforma a} \quad u_c(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n (cs_i \cdot u_s(x_i))^2}$$

On $(\partial f / \partial x_i)$ és el coeficients de sensibilitat (cs_i).

3.2.4.3. Fonts d'incertesa correlacionades

En els casos on alguna de les fonts d'incertesa, de les quals depèn el mesurand, es troben relacionades entre elles, s'ha de tenir en compte aquesta dependència alhora de realitzar els càlculs. La covariància ($u(x_i, x_j)$) quantifica la correlació existent entre les diferents fonts i s'afegeix a la fórmula anterior de la següent manera (39):

$$u_c^2(y) = \sum_{i=1}^n (cs_i \cdot u_s(x_i))^2 + 2 \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n cs_i \cdot cs_j \cdot u(x_i, x_j)$$

On també es pot expressar la covariància a partir del coeficient de correlació ($r(x_i, x_j)$). Aquest pren valors entre -1 i +1, sent 0 quan les variables x_i i x_j són independents entre elles i la variació d'una no produeix cap canvi en l'altra. La fórmula és:

$$u(x_i, x_j) = u_s(x_i) \cdot u_s(x_j) \cdot r(x_i, x_j)$$

3.2.4.4. Combinació simplificada

En alguns cassos, les expressions per combinar les incerteses estàndards es poden reduir a unes fórmules més senzilles. Principalment, poden ser útils per l'estimació d'incerteses estàndard d'alguna de les possibles font que depengui, també, de diferents factors. Tot seguit, es mostren tres normes simples per estimar la incertesa combinada (7, 40).

- *Norma 1:*

Per aquelles magnituds que depenen de diferents factors que es sumen o es resten entre ells, és a dir s'expressen com $y = (x_1 + x_2 + x_3 - \dots)$, la incertesa combinada (u_c) s'obté:

$$u_c(y) = \sqrt{\left((u(x_1))^2 + (u(x_2))^2 + (u(x_3))^2 + \dots\right)}$$

- *Norma 2:*

Per aquelles magnituds que depenen de diferents factors que es multipliquen o es divideixen entre ells, és a dir s'expressen com $y = (x_1 \times x_2 \times x_3 \times \dots)$ o com $y = \frac{x_1}{(x_2 \times x_3)}$, la incertesa combinada (u_c) s'obté:

$$u_c(y) = y \sqrt{\left(\left(\frac{u(x_1)}{x_1}\right)^2 + \left(\frac{u(x_2)}{x_2}\right)^2 + \dots\right)}$$

- Norma 3:

Per aquelles magnituds que depenen de diferents factors que es relacionen entre ells tant com a la norma 1 com la norma 2, és a dir s'expressen com, per exemple:

$$y = \frac{x_1}{(x_2 + x_3)}, \text{ s'ha de separar l'expressió en } (x_2 + x_3) \text{ i } (x_1/q), \text{ on } q = (x_2 + x_3).$$

Així la incertesa combinada s'obté primer utilitzant la norma 1 per $(x_2 + x_3)$ i després la norma 2 per (x_1/q) .

3.2.5. Estimació de la incertesa expandida

La incertesa expandida, simbolitzada com U , s'obté a partir de la multiplicació de la incertesa estàndard combinada (u_c) per un factor de cobertura (k) seleccionat (39, 40).

$$U = k \cdot u_c(y)$$

Un resultat (Y) d'una mesura determinada es expressa correctament al tenir en compte la incertesa expandida de la següent manera: $(Y \pm U)$ unitats. Així doncs, la incertesa expandida simbolitza un interval en el que es suposa trobar una gran part de la distribució dels valors del resultat produïda per la dispersió atribuïda al mesurand. En altres paraules, aquest interval inclou el valor verdader del mesurand amb una probabilitat (p).

El factor de cobertura (k) ve determinat per la distribució de freqüències dels valors del mesurand, pels graus de llibertat i per un nivell de confiança amb una probabilitat determinada. D'aquesta manera, es pot definir com el producte de la desviació estàndard (expressada com u_c) d'una distribució de probabilitat determinada que agafa un determinat % dels valors de la distribució.

Teòricament, per conèixer la distribució de freqüències o de probabilitats dels valors del mesurand només fa falta realitzar una combinació de cadascuna de les distribucions de les fonts d'incertesa estudiades, tenint en compte la mida de la seva contribució a la incertesa de mesura. Però a la pràctica, s'han de tenir coneixements en

estadística avançada per poder realitzar, amb l'ajuda d'algun programa informàtic, els càlculs necessaris per obtenir la funció de la distribució del mesurand (56). Per altra banda, és important tenir en compte que moltes de les distribucions de freqüències assignades a les fonts no deixen de ser estimacions, ja que es difícil d'obtenir una funció matemàtica de la distribució amb la informació disponible. Així doncs, s'ha partit del supòsit que el mesurand d'aquest estudi (concentració catalítica d'un enzim) segueix una distribució normal. A més a més, per corroborar-ho es van realitzar les proves de normalitat, no paramètriques, de *Kolmogorov-Smirnov* amb la modificació de *Lilliefors* per $n > 50$ i de *Shapiro-Wilk* per $n < 50$ a diferents dades del mesurand obtingudes en condicions de mesures repetides, les quals són comparades amb la corba teòrica d'una distribució normal. Es va utilitzar per l'anàlisi el programa informàtic *IBM SPSS Statistics v 19*.

Els graus de llibertat (ν) és el nombre de termes independents en un experiment estadístic, és a dir, és un indicador del nombre de les dades utilitzades per realitzar l'experiment. La distribució normal es caracteritza per tenir infinits graus de llibertat, per tant, sempre que els $\nu \neq \infty$ es parla d'una distribució de t de Student (57). En aquesta distribució variarà el valor de (k) per un nivell de confiança determinat segons els (ν). Els graus de llibertat atribuïts al mesurand s'obtenen a partir de la fórmula de *Welch-Satterthwaite* (39):

$$\nu_{ef} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^n \frac{u_i^4(y)}{\nu_i}}$$

On (ν_{ef}) són els graus de llibertat efectius d'una funció (y) que depen de diverses variables (x_i), $y = f(x_i)$; (ν_i) són els graus de llibertat per cada font d'incertesa i $u_i^4(y) = [u_s(x_i) \cdot cs_i]^4$.

Això implica, primer de tot, conèixer els graus de llibertat de cadascuna de les fonts d'incertesa estudiades. Per les estimacions de tipus A els (ν) s'obtenen del nombre de mesures independents (n) realitzades. L'estimació de la variància correspon a ($\nu = n - 1$). Per les estimacions de tipus B, el càlcul dels (ν) és més difícil ja que s'utilitza el propi criteri personal. La incertesa amb un factor de cobertura ($k = 2$) per

un nivell de confiança del 95 % té ∞ graus de llibertat (39). Però per poder aplicar la fórmula anterior s'ha considerat que aquestes tenen com a mínim 10 graus de llibertat.

Normalment s'utilitza un nivell de confiança del 95 % i si es vol ser més estricte del 99 %, els quals per una distribució normal indiquen un $k = 1,96$ i $2,58$, respectivament per $\nu = \infty$, tot i que aquests valors s'arrodoneixen a 2 (95,45 %) i a 3 (99,73 %). Per altra banda, es recomana (39) utilitzar els valors (k) de la Taula 3 d'una distribució t de Student per $\nu \leq 6$, encara que seria més convenient quan $\nu < 20$, ja que a partir de 20 els valors de (k) són més propers a 2 (54).

Taula 3. Distribució t de Student per un nivell de significació de 0,05 (2 cues).

Graus de llibertat (ν)	Factor de cobertura (k)
1	12,71
2	4,30
3	3,18
4	2,77
5	2,57
6	2,45
10	2,23
20	2,09
30	2,04
120	1,98
∞	1,96

3.2.6. Expressió de la incertesa de mesura

La incertesa de mesura sempre s'informa conjuntament amb el resultat del mesurand. Així doncs, s'entén que qualsevol resultat d'una mesura determinada no estarà complert si no va acompanyat de la seva incertesa. La incertesa de mesura s'expressa normalment, com a incertesa expandida (U), tot i que, també es pot expressar el resultat del mesurand acompanyat de la incertesa estàndard combinada (u_c) (39, 40).

La incertesa estàndard combinada d'un resultat (R) s'informa de la següent manera:

- R unitats amb una incertesa de mesura u_c unitats, per exemple amilasa = 10,5 $\mu\text{kat/L}$ amb una incertesa estàndard combinada de 0,2 $\mu\text{kat/L}$.
- $R (u_c)$ unitats, per exemple amilasa = 10,5 (0,2) $\mu\text{kat/L}$, on el valor entre parèntesis correspon al valor de la incertesa estàndard combinada expressada amb les mateixes unitats que el resultat.

(Nota: La utilització del símbol \pm no es recomanable quan s'utilitzen incerteses estàndards, ja que aquest símbol es troba associat amb intervals corresponents a elevats nivells de confiança).

La incertesa expandida d'un resultat (R) s'informa:

- $(R \pm U)$ unitats (per un factor de cobertura k basat en una determinada distribució que proporciona un nivell de confiança determinat), per exemple amilasa: $(10,5 \pm 0,4) \mu\text{kat/L}$ ($k = 2$ basat en una distribució normal per un nivell de confiança d'aproximadament un 95 %).

El valor de la incertesa de mesura, independentment de la manera d'expressar-lo, també pot ser informat en forma relativa sempre que es cregui oportú. Per altra banda, aquest valor, com el del resultat, es convenient no donar-los amb un nombre excessiu de dígit, així s'aconsella utilitzar al menys dos dígit significatius.

4. RESULTATS

4.1. γ -Glutamiltransferasa

4.1.1. Definició del mesurand

El mesurand es defineix com la concentració catalítica ($\mu\text{kat/L}$) de γ -glutamiltransferasa (GGT) en plasma o sèrum mesurada mitjançant la velocitat de conversió de l'L- γ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida a 37 °C en el procediment de mesura de referència primari de la IFCC.

El principi de la reacció es basa en la transferència del grup L- γ -glutamil del substrat L- γ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida a un altre substrat acceptor. La glicilglicina actua a la vegada de substrat acceptor i de tampó a pH 7,7 (37 °C). Els productes de la reacció són l'L- γ -glutamil-glicilglicina i el 5-amino-2-nitrobenzoat. Aquest últim és l'indicador de la reacció ja que té una màxima absorbància a 410 nm (Figura 17).

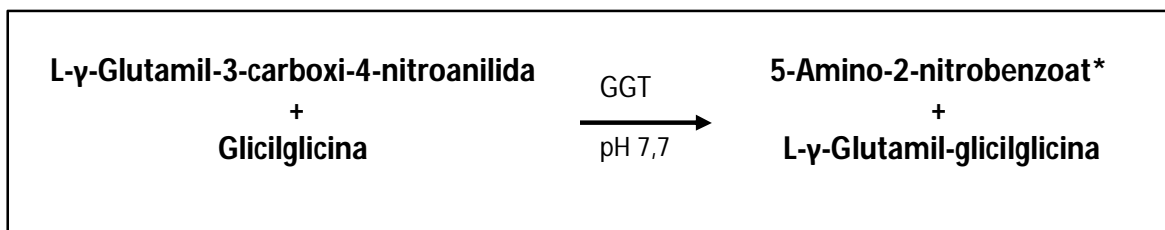
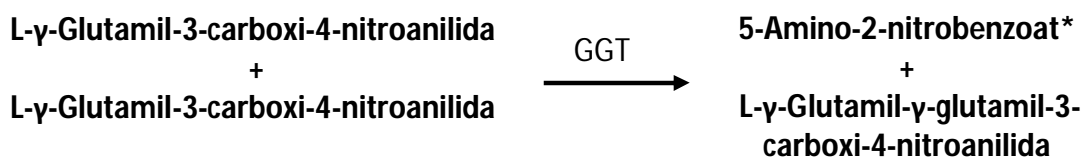


Figura 17. Reacció catalitzada per l'enzim GGT. (*) Producte indicador.

Al mateix temps es dona una reacció d'autotransferència que equival aproximadament a un 1 % del producte format:



4.1.2. Identificació de les fonts d'incertesa

Tots aquells factors els quals es creu que generen variabilitat dels valors de concentració catalítica del mesurand es detallen al diagrama de la Figura 18. Aquestes fonts es mostren agrupades en vuit categories:

1. *Reactius*: qualitat de l'aigua, interferents i lots dels reactius, contingut d'aigua, puresa i caducitat dels reactius.
2. *Solucions de reacció i d'inici*: massa dels reactius, ajust de pH, arrasament i caducitat de les solucions.
3. *Espectròmetre*: longitud d'ona, exactitud de les absorbàncies, linealitat, amplada de banda, pas de llum, línia base i temps programats d'incubació i de cinètica.
4. *Mesures*: temperatura, fracció de volum de mostra, temps de preincubació i cubetes.
5. *Factors de correcció*: blanc de reactiu, massa i densitat de l'aigua de reconstitució del liofilitzat, i volums dispensats de mostra i reactius.
6. *Processament de les dades*: arrodoniment, valors aberrants i coeficient d'absorció molar.
7. *Variabilitat*: imprecisió en condicions intermèdies.
8. *Tractament de les mostres*: temperatura de l'aigua de reconstitució del liofilitzat, temps i temperatura durant la reconstitució, blanc de mostra, dilució i estabilitat de l'enzim a les mostres.

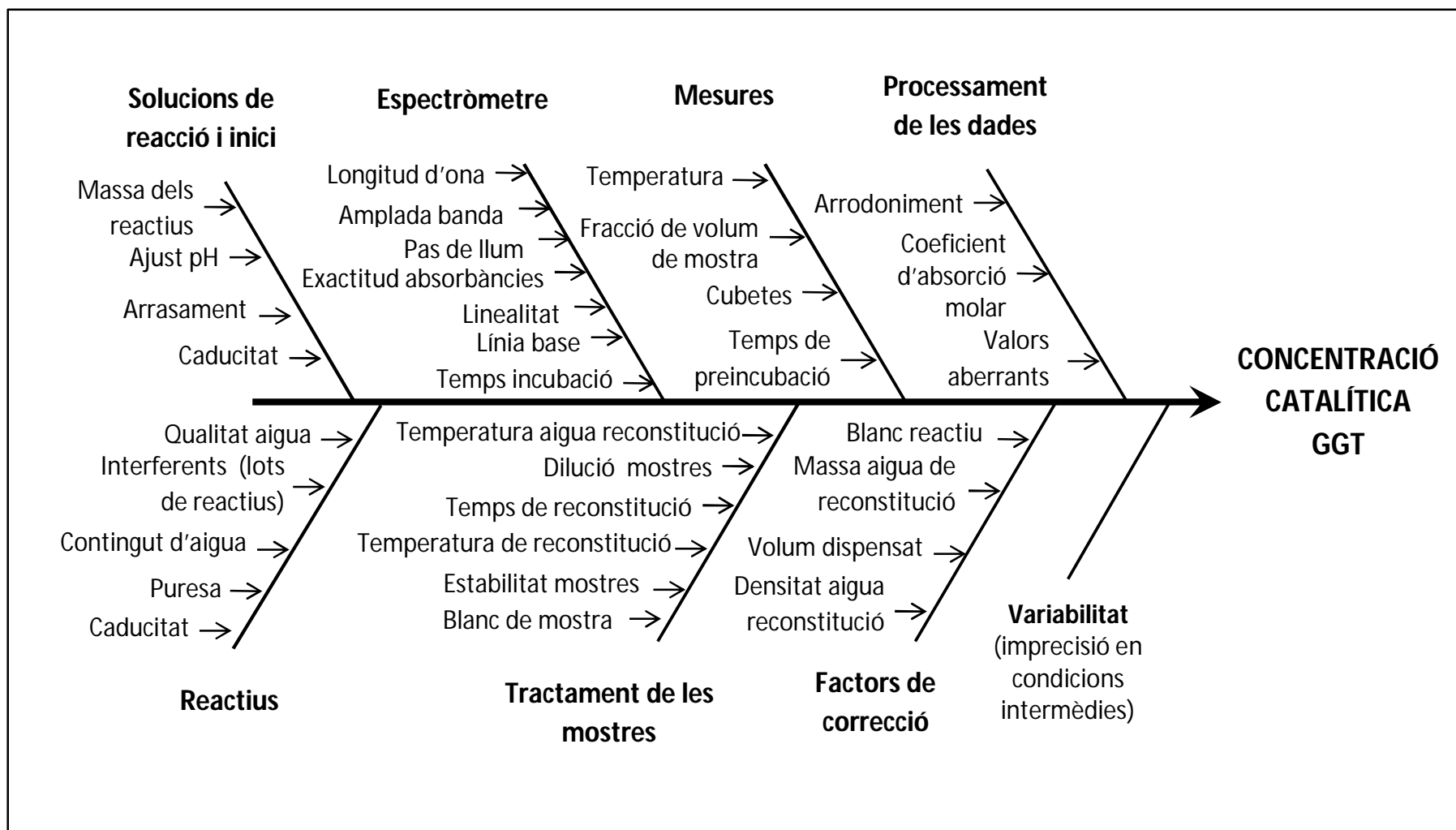


Figura 18. Diagrama de causa i efecte de les possibles fonts d'incertesa del procediment per la mesura de concentració catalítica de l'enzim GGT.

4.1.3. Estudi de les fonts d'incertesa: estimació de la incertesa estàndard i càlcul dels coeficients de sensibilitat

4.1.3.1. Reactius

4.1.3.1.1. Qualitat de l'aigua

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

L'aigua utilitzada per preparar les solucions de reacció i d'inici ha de tenir un pH comprès entre 6,0 i 7,0 i una conductivitat $< 2,0 \mu\text{S}/\text{cm}$.

- *Incertesa estàndard:*

En aquest estudi es va utilitzar aigua destil·lada de qualitat "Milli Q". Es va comprovar que les propietats (pH i conductivitat) de l'aigua utilitzada es mantinguessin dins dels intervals dels requisits fixats. El fet de conservar els estrets marges dels requisits evita la variabilitat en el procediment de mesura i alhora en els valors del mesurand. Per tant, en base a l'experiència pràctica es va considerar inapreciable la incertesa produïda per aquesta font.

4.1.3.1.2. Interferents i lots dels reactius

Les diferències entre els diferents lots d'un reactiu són degudes a les variacions en la concentració de les impureses existents en cadascun d'ells. La presència de més o menys concentració d'impureses és el factor que pot generar dispersió en els valors del mesurand. Únicament es va considerar apreciable la variació dels valors quan les impureses actuaven com a interferents en el procediment de mesura.

El procediment utilitza dos reactius que intervenen en la reacció: l'N-glicilglicina i l'L- γ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida.

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

L'interferent glicina del reactiu N-glicilglicina ha de ser $< 0,1 \%$, i l'interferent 5-amino-2-nitrobenzoat del reactiu L- γ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida ha de ser, també, $< 0,1 \%$. Tots dos són inhibidors de l'activitat de la GGT, però es coneix que el primer té un efecte més potent que el segon.

- *Incertesa estàndard:*

Glicina: l'oferta de reactius d'N-glicilglicina en el mercat no compleix amb els requisits del procediment de mesura de referència. Per tant, es va utilitzar el reactiu que s'apropava més a les condicions desitjades en el que la quantitat de glicina era < 0,15 %. Això indicava que la proporció de glicina al reactiu oscil·lava entre 0 i 0,15 %. Tenint en compte aquest interval es va estimar la incertesa estàndard (u_s) de la concentració de glicina de la següent manera:

$$u_s = \frac{(0,15 - 0)}{2 \times \sqrt{3}} = 0,043 \%$$

Es va dividir entre 2 per obtenir la semiamplicitud de l'interval, i per $\sqrt{3}$ ja que es va considerar que els valors de la concentració de glicina en el reactiu segueixen una distribució rectangular.

5-Amino-2-nitrobenzoat: per aquest interferent es complia el requisit < 0,1 %. La incertesa estàndard (u_s) de la seva concentració al reactiu es va calcular igual que a l'exemple anterior:

$$u_s = \frac{(0,1 - 0)}{2 \times \sqrt{3}} = 0,029 \%$$

- *Coefficient de sensibilitat:*

Glicina: es van preparar 3 solucions de reacció amb concentracions de glicina diferents. La primera, segons el reactiu d'N-glicilglicina, es va considerar que tenia un 0,15 % de glicina. A la segona i a la tercera se'ls va afegir un 0,05 % i un 0,10 % més de glicina, aconseguint una concentració final de 0,2 i 0,3 %, respectivament. Per cadascuna de les condicions es van realitzar mesures per quadruplicat del SCH II. A la Taula 4 es mostren els resultats de concentració catalítica obtinguts segons la concentració de glicina.

Taula 4. Valors de la concentració catalítica de la GGT segons la concentració de glicina.

Glicina (%)	Concentració catalítica (μkat/L)				Mitjana
0,15	2,557	2,540	2,490	2,519	2,526
0,20	2,511	2,470	2,504	2,522	2,502
0,30	2,469	2,481	2,471	2,489	2,477

A partir de les mitjanes es va calcular el % de variació de la concentració catalítica segons la concentració de glicina del reactiu. A la Figura 19 s'observa una variació significativa del 12,4 % del valor del mesurand per cada 1 % de glicina.

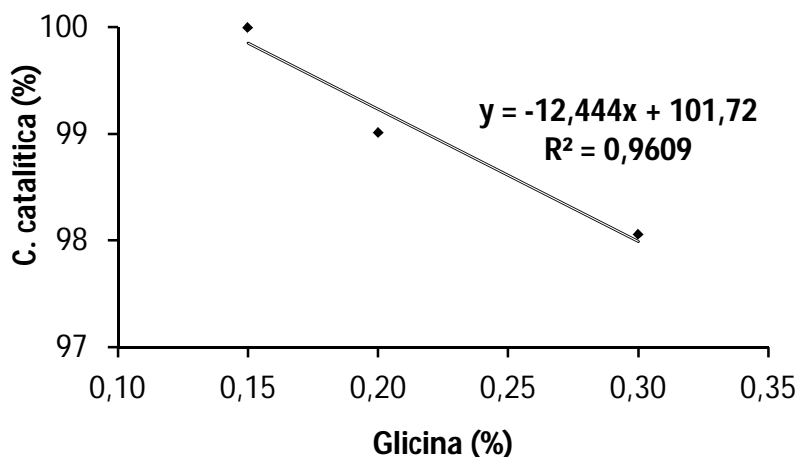


Figura 19. Variació de la concentració catalítica de la GGT (%) segons l'interferent glicina.

5-Amino-2-nitrobenzoat: es van preparar 4 solucions d'inici amb diferents concentracions de l'interferent. La primera, segons el certificat del reactiu, tenia una concentració de 0,03 %. Les altres solucions es van preparar amb concentracions de 0,06, 0,12 i 0,15 %, afegint la proporció de 5-amino-2-nitrobenzoat necessari. Per cadascuna de les condicions es van realitzar mesures per quadruplicat del SCH II. Els resultats obtinguts es mostren a la Taula 5. Com es pot observar no es va obtenir una disminució proporcional de la concentració catalítica a mesura que augmentava la proporció d'interferent, com s'esperava. Els canvis produïts en la concentració catalítica del mesurand eren d'aproximadament un 0,3 % per cada 0,1 % d'interferent, però es van trobar no significatius amb una $p = 0,13$ (ANOVA $\alpha = 0,05$). L'estudi es va repetir obtenint resultats sense variacions significatives amb els que s'acaben de presentar.

Taula 5. Valors de la concentració catalítica de la GGT segons la concentració de l'interferent 5-amino-2-nitrobenzoat.

Interferent (%)	Concentració catalítica ($\mu\text{kat/L}$)				Mitjana
0,03	2,526	2,492	2,507	2,534	2,515
0,06	2,495	2,493	2,488	2,492	2,492
0,12	2,514	2,490	2,508	2,510	2,506
0,15	2,493	2,501	2,491	2,518	2,501

Per altra banda també es va estudiar la influència del canvi de lots de reactiu en la concentració catalítica. Pel reactiu N-glicilglicina es disposaven dels lots: #944#, #851# i #813#, amb els quals es van preparar 3 solucions de reacció diferents. Pel reactiu L- γ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida es disposaven dels lots: #425#, #726# i #923#, amb els quals es van preparar 3 solucions d'inici diferents. Es va mesurar la concentració catalítica per quadruplicat del SCH II utilitzant cada solució de reacció amb una única solució d'inici (#425#), i cada solució d'inici amb la solució de reacció lot #944#. A la Taula 6 es mostren els valors de les mitjanes de concentració catalítica dels quadruplicats. Les diferències observades entre els valors de les mitjanes tant pels diferents lots de reactiu d'N-glicilglicina com d'L- γ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida no van ser significatives. Es van obtenir unes $p = 0,96$ i $0,25$ en una anàlisi ANOVA, amb un nivell de significació $\alpha = 0,05$. Degut a que no es van trobar variacions entre els valors de concentració catalítica obtinguts amb les 3 solucions de reacció, es va considerar que la concentració de glicina existent entre els diferents lots de reactiu d'N-glicilglicina, sempre $< 0,15\%$, era pràcticament constant.

Taula 6. Valors de la mitjana de concentració catalítica de la GGT segons els lots de reactiu.

	Concentració catalítica ($\mu\text{kat/L}$)		
Lots N-glicilglicina	#944#	#813#	#851#
S. L- γ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida #425#	2,528	2,529	2,532
Lots L- γ-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida	#425#	#923#	#726#
S. N-glicilglicina #944#	2,528	2,523	2,503

4.1.3.1.3. *Contingut d'aigua dels reactius*

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

El reactiu N-glicilglicina, amb massa molar 132,1 g/mol, ha de ser anhidre i el reactiu L- γ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida amb massa molar 346,3 g/mol, ha de ser monohidrat.

- *Incertesa estàndard:*

L'ús dels reactius amb les característiques desitjades descarta el contingut d'aigua com a font d'incertesa. En aquest estudi es va utilitzar el reactiu N-glicilglicina, amb número de referència 104233 (Merck), que complia amb les característiques del requisits. Per tant, el seu contingut d'aigua no contribueix a la incertesa de mesura.

Al contrari, el reactiu L- γ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida, amb número de referència 10413151 (Roche), que es va fer servir no complia amb el requisit, ja que era anhidre (massa molar: 328,3 g/mol). En aquest cas s'hauria de provar l'existència de canvis significatius en la concentració catalítica del mesurand. Per aquest reactiu només es disposava d'un únic proveïdor que proporcionava aquesta matèria primera amb les característiques: anhidre i massa molar 328,3 g/mol. Per tant, no va ser possible comprovar l'efecte en la concentració catalítica del contingut d'aigua. És important destacar que la quantitat de massa del reactiu utilitzada per preparar les solucions es va corregir per la massa molar del reactiu. Així, es van mantenir les condicions del procediment de mesura de referència el més similars possible.

Per altra banda, els reactius hidrofílics s'han de conservar amb dessecant per mantenir les seves propietats inicials. L'excés d'aigua que puguin absorbir podria ser una font d'incertesa.

4.1.3.1.4. *Puresa dels reactius*

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

Quan la puresa dels reactius és $< 100\%$ (ex. $yz\%$), s'ha de corregir la massa dels reactius de les solucions utilitzant el factor, $F = 100/yz$. Per altra banda, la incertesa expandida per quantificar la massa del reactiu, on també s'inclou la puresa del reactiu, ha de ser $\leq 1,5\%$ ($k = 2$ per una distribució normal). A partir d'aquesta dada es va establir una incertesa per la puresa $< 0,5\%$ ($k = 2$, interval de confiança del 95%).

- *Incertesa estàndard:*

Els fabricants no especificaven el valor de la incertesa de la puresa dels dos reactius del procediment de mesura. Tampoc es va poder assegurar si es complia o no amb el requisit. Per tant, es va estimar la incertesa estàndard (u_s) del valor de la puresa tenint en compte el requisit de 0,5 % ($k = 2$):

$$u_s = \frac{0,5}{2} = 0,25 \text{ \%}.$$

- *Coefficient de sensibilitat:*

La puresa del reactiu pot generar variacions en la concentració dels dos reactius a les solucions de reacció i d'inici < 1 %. Aquestes variacions, com s'observa a l'apartat posterior 4.1.3.2.1, no van comportar canvis significatius en la concentració catalítica de l'enzim. Així doncs, el valor del coeficient de sensibilitat es va considerar 0 i es va excloure la contribució d'aquesta font a la incertesa de mesura.

4.1.3.1.5. Caducitat dels reactius

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

Els reactius han de mantenir les seves característiques inicials, indicades pels proveïdors, per poder ser utilitzats, per tant s'han d'utilitzar abans de la seva data de caducitat.

- *Incertesa estàndard:*

Els reactius s'han de mantenir en unes condicions d'emmagatzematge idònies perquè les característiques inicials siguin les desitjades per al seu ús. Els lots dels reactius N-glicilglicina i L-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida que es van fer servir en aquest estudi, tenien una data de caducitat indicada pel fabricant i es van conservar a temperatura ambient i a 4 °C, respectivament, com especifica el seu certificat. Les temperatures d'emmagatzematge es van controlar diàriament per mantenir la qualitat dels reactius. A més a més no es van utilitzar els reactius fora de la seva data de caducitat. Es va considerar que els reactius mantenien les seves característiques inicials i, per tant, la seva caducitat es va descartar com a font d'incertesa.

4.1.3.2. Solucions de reacció i d'inici

4.1.3.2.1. Massa dels reactius

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

Com s'ha comentat a l'apartat 4.1.3.1.4, la incertesa de la quantitat de massa de reactiu per cadascuna de les pesades, juntament amb la puresa del reactiu, ha de ser $\leq 1,5\%$ ($k = 2$ per una distribució normal). Per tant, es va establir una incertesa $\leq 1\%$ ($k = 2$, interval de confiança del 95 %) per al valor de la massa del reactiu en cada pesada.

- *Incertesa estàndard*

La solució de reacció (SR) es compon de 206,3 mmol/L d'N-glicilglicina i la solució d'inici (SI) de 33,0 mmol/L d'L- γ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida. La incertesa estàndard de la massa dels reactius es va estimar separatament per les dues solucions. Es va utilitzar la informació del certificat de calibratge número 09/34513862 (novembre 2009) de la balança analítica. Es van tenir en compte les quantitats de massa de reactiu especificades al PNT-005 (Annex 1), per la solució de reacció, 2,73 g d'N-glicilglicina, i per la solució d'inici, 0,217 g d'L- γ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida. La balança tenia una incertesa expandida (U) per aquests valors de 0,13 mg i 0,12 mg, respectivament. La incertesa estàndard (u_s) es va estimar en % respecte a la massa del reactiu i considerant el factor de cobertura $k = 2$ (Taula 7).

Taula 7. Incertesa estàndard de la massa dels reactius.

	Massa (g)	U (g)	U (%)	u_s (%)
SR	2,730	$1,3 \cdot 10^{-4}$	0,0048	0,0024
SI	0,217	$1,2 \cdot 10^{-4}$	0,0553	0,0277

- *Coeficient de sensibilitat:*

Es va modificar la quantitat de massa de les dues solucions, SR i SI, en un $\pm 1\%$. Es van preparar tres solucions de reacció diferents: SR-(2,76), SR-(2,73) i SR-(2,70), i tres solucions d'inici diferents: SI-(0,219), SI-(0,217) i SI-(0,215). Es va mesurar la concentració catalítica del mesurand per quadruplicat del SCH II utilitzant cada solució de reacció

preparada amb la SI-(0,217), i cadascuna de les solucions d'inici amb la SR-(2,73). També es va mesurar la concentració catalítica del SCH II, per triplicat, utilitzant les combinacions: SR-(2,76) i SI-(0,219); SR-(2,73) i SI-(0,217); i SR-(2,70) i SI-(0,215), amb la mateixa variació en la quantitat de massa del reactiu. A la Taula 8 es mostren els resultats obtinguts. Les variacions de la quantitat de massa no van produir canvis significatius entre els valors mitjans de concentració catalítica, es va obtenir una $p = 0,89$ per una anàlisi ANOVA amb contrast *Scheffé* ($\alpha = 0,05$), a excepció de la condició, SR-(2,70) i SI-(0,215), en la que els valors de concentració eren un 1,6 % més baixos ($p = 0,03$). Es va suposar que el coeficient de variació per la quantitat de massa prenia un valor molt proper a 0.

Taula 8. Valors de la concentració catalítica de la GGT segons la variació en la quantitat de massa del reactiu.

Solucions	Concentració catalítica ($\mu\text{kat/L}$)				Mitjana	%
SR-(2,73) + SI-(0,217)	2,504	2,520	2,496	2,545	2,516	100,0
SR-(2,76) + SI-(0,217)	2,539	2,529	2,515	2,514	2,524	100,3
SR-(2,70) + SI-(0,217)	2,538	2,490	2,528	2,531	2,522	100,2
SR-(2,73) + SI-(0,219)	2,509	2,537	2,518	2,484	2,512	99,8
SR-(2,73) + SI-(0,215)	2,559	2,502	2,543	2,500	2,526	100,4
Solucions	Concentració catalítica ($\mu\text{kat/L}$)				Mitjana	%
SR-(2,73) + SI-(0,217)	2,493	2,510	2,538	-	2,514	100,0
SR-(2,76) + SI-(0,219)	2,493	2,504	2,502	-	2,499	99,4
SR-(2,70) + SI-(0,215)	2,480	2,468	2,471	-	2,473	98,4

4.1.3.2.2. Ajust del pH

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

La incertesa expandida del valor del pH ha de ser $\leq 0,05$ ($k = 2$).

- *Incertesa estàndard:*

La reacció catalitzada per la GGT es realitza a pH 7,70 (37 °C). El volum de la barreja de reacció està format en major part per la solució de reacció. Per tant, únicament aquesta solució es va haver d'ajustar a pH 7,70 a 37 °C.

El pHmetre es calibra diàriament amb tres solucions tampó certificades de pH (4,01 ± 0,02), (7,00 ± 0,02) i (11,00 ± 0,02) (k = 2). Les especificacions de l'equip descriuen que la sonda de temperatura de l'elèctrode de pH presenta una desviació de ± 0,1 °C. Aquesta desviació produeix variacions de pH inferiors a la incertesa de les solucions tampó (< 0,002 pH per 0,1°C), pel que es va poder descartar la seva contribució a la incertesa de mesura del pH.

La incertesa estàndard del valor de pH de la solució de reacció es va estimar combinant les incerteses estàndard de les 3 solucions tampó certificades:

$$u_s = \sqrt{3 \times (0,01)^2} = 0,0173 \text{ pH.}$$

- *Coefficient de sensibilitat:*

Es van preparar cinc solucions de reacció diferents. A cadascuna d'elles es va ajustar el pH a 37 °C: 7,605 per la solució 1, 7,659 per la solució 2, 7,706 per la solució 3, 7,753 per la solució 4 i 7,808 per la solució 5. L'increment de pH entre les solucions era d'aproximadament 0,05 unitats. Després es van realitzar tres mesures de concentració catalítica del SCH II per cadascuna de les cinc solucions de reacció anteriors. A la Taula 9 s'observen els resultats obtinguts.

Taula 9. Valors de la concentració catalítica de la GGT segons la variació de pH.

pH	Concentració catalítica (µkat/L)			Mitjana
7,605	2,435	2,430	2,442	2,435
7,659	2,467	2,432	2,483	2,461
7,706	2,470	2,491	2,487	2,483
7,753	2,526	2,505	2,514	2,515
7,808	2,531	2,516	2,549	2,532

A la Figura 20 es representen els valors de concentració catalítica de les mitjanes en %. La correlació de les dades va generar un coeficient de sensibilitat del 19,1 % per unitat de pH. Aquest coeficient corresponia a una variació de la concentració catalítica de 0,493 µkat/L per unitat de pH.

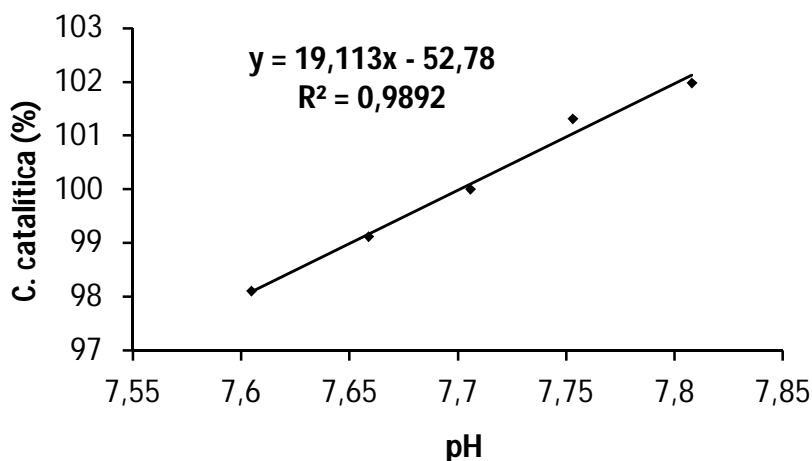


Figura 20. Variació de la concentració catalítica (%) segons el pH de la solució de reacció.

4.1.3.2.3. Arrasament de les solucions

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

S'han d'utilitzar matraus de vidre de classe A per mesurar el volum de les solucions de reacció i d'inici. L'arrasament es va realitzar a una temperatura de $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$ en un bany d'aigua amb termostatació, controlant la temperatura de la solució de l'interior del matrau amb un termòmetre de vidre.

- *Incertesa estàndard:*

La incertesa estàndard del volum de les solucions produïda per l'arrasament dels matraus es va estimar separatament per les solucions de reacció i d'inici. El volum es veu afectat, principalment, per 3 factors: a) el calibratge del matrau, b) la repetibilitat de l'arrasament i c) l'expansió del volum d'aigua segons la temperatura.

- Calibratge del matrau: Es van utilitzar matraus de 100 mL per arrasar la solució de reacció i de 20 mL per arrasar la solució d'inici. Els certificats dels matraus especificaven un volum de $(100 \pm 0,04)$ mL i de $(20 \pm 0,015)$ mL, respectivament. Com el valor de la incertesa s'especificava sense un nivell de confiança i sense cap informació sobre la distribució dels valors de volum, es va assumir que els valors adoptaven una distribució triangular. Per tant, la incertesa estàndard es va calcular:

$$\text{SR: } u_{sc} = \frac{0,040 \text{ mL}}{\sqrt{6}} = 0,016 \text{ mL}$$

$$\text{SI: } u_{sc} = \frac{0,015 \text{ mL}}{\sqrt{6}} = 0,006 \text{ mL}$$

- b) Repetibilitat: La incertesa deguda a la variació del volum produïda cada vegada que s'omple el matrau es va poder estimar mitjançant un experiment de repetibilitat. Es van realitzar 10 arrasaments diferents dels matraus pesant cada vegada la seva massa. Es va obtenir una desviació estàndard de 0,016 mL pel matrau de 100 mL, i de 0,015 mL pel matrau de 20 mL. Per estimar la incertesa estàndard es va utilitzar l'error estàndard de la mitjana:

$$\text{SR: } u_{sr} = \frac{0,016}{\sqrt{10}} = 0,0051 \text{ mL}$$

$$\text{SI: } u_{sr} = \frac{0,015}{\sqrt{10}} = 0,0047 \text{ mL}$$

- c) Expansió del volum d'aigua segons la temperatura: L'estimació de la incertesa estàndard d'aquest factor es va realitzar tenint en compte el rang de variació de la temperatura i el coeficient d'expansió del volum d'aigua. Per una banda, l'arrasament sempre es realitzava a 20 °C amb un marge de ± 1 °C. Per l'altra, el coeficient d'expansió prenia un valor de $(2,1 \times 10^{-4})$ °C⁻¹, tenint en compte la variació de la densitat de l'aigua amb la temperatura (58). Així es va obtenir una variació de volum del:

$$\text{SR: } (100 \times \pm 1 \times 2,1 \times 10^{-4}) = \pm 0,021 \text{ mL}$$

$$\text{SI: } (20 \times \pm 1 \times 2,1 \times 10^{-4}) = \pm 0,0042 \text{ mL}$$

La incertesa es va calcular suposant que els valors de la temperatura adoptaven una distribució rectangular:

$$\text{SR: } u_{st} = \frac{0,021}{\sqrt{3}} = 0,012 \text{ mL}$$

$$\text{SI: } u_{st} = \frac{0,004}{\sqrt{3}} = 0,0024 \text{ mL}$$

Finalment les tres contribucions es van combinar per donar la incertesa estàndard combinada de l'arrasament de les solucions:

$$\text{SR: } u_s = \sqrt{(0,0051^2 + 0,021^2 + 0,012^2)} = 0,021 \text{ mL}$$

$$\text{SI: } u_s = \sqrt{(0,0047^2 + 0,0042^2 + 0,0024^2)} = 0,0081 \text{ mL}$$

- *Coefficient de sensibilitat:*

A l'apartat 4.1.3.2.1 s'ha mostrat com les variacions en la concentració del reactiu < 1 % no comportaven canvis significatius en els valors de concentració catalítica del mesurand. Les incerteses dels volums de les solucions obtingudes anteriorment no van incrementar la variació de la concentració dels reactius en més d'un 1 % (increments de 0,02 % per la glicilglicina i de 0,01 % per l'L- γ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida), per tant, es va considerar que el coeficient de sensibilitat prenia un valor molt proper a 0.

4.1.3.2.4. *Caducitat de les solucions*

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

No es poden utilitzar les solucions de reacció i d'inici caducades, és a dir després de 14 o 7 dies, respectivament, de la seva preparació.

- *Incertesa estàndard:*

Es va comprovar el comportament de les dues solucions abans i després de les seves dates de caducitat. Es va mesurar per triplicat el mesurand en el SCH II els dies 1, 8, 15 i 22 després de la preparació de les solucions, i pels dies 15 i 22 es va preparar una nova solució d'inici, per poder veure les diferències en la concentració catalítica amb la solució d'inici caducada. A la Taula 10 es representen els valors de les mitjanes de concentració catalítica obtinguts per cada dia i condició. Es van observar diferències significatives entre el valor del dia 22 amb SI caducada i els dos valors del dia 15, amb una $p < 0,03$ per una anàlisi ANOVA amb contrast *Scheffé* ($\alpha = 0,05$).

Taula 10. Valors de la concentració catalítica de la GGT segons la caducitat de les solucions de reacció i d'inici.

Dia	SI- nova ($\mu\text{kat/L}$)	SI-caducada ($\mu\text{kat/L}$)
1	2,516	-
8	-	2,533
15	2,489	2,504
22	2,522	2,549

Per altra banda, es va observar que l'absorbància a 410 nm de la solució d'inici augmentava amb el temps (Taula 11), degut possiblement a la degradació de l'L- γ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida en 5-amino-2-nitrobenzoat, el producte de la reacció.

Taula 11. Variació de l'absorbància de la SI amb el temps.

Dia	Absorbància
1	1,675
8	1,798
15	1,896
22	1,922

En general, els valors de concentració catalítica eren lleugerament més elevats quan s'utilitzava SI-caducada, degut, possiblement, a la inestabilitat del substrat L- γ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida. Aquests resultats verificaven la bona qualitat de les solucions en el seu temps de vida establert. Per tant, es va descartar la influència de la caducitat de les solucions a la incertesa de mesura.

4.1.3.3. Espectròmetre

4.1.3.3.1. Longitud d'ona

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

S'accepta una desviació de la longitud d'ona de (410 ± 1) nm.

- *Incertesa estàndard:*

Anualment es realitza una verificació de l'exactitud de la longitud d'ona mitjançant un patró certificat d'òxid d'holmi. El certificat del lot HC894655 especifica una exactitud per a la longitud d'ona 410 nm de $(416,1 \pm 0,2)$ nm. L'espectròmetre durant els tres anys d'estudi (2008-2011) mostrà una desviació de -0,1 nm a 416,1 nm. Degut a que aquesta desviació es trobava dins de l'interval de la incertesa del patró, expressada com exactitud, la incertesa estàndard del valor de la longitud d'ona es va estimar només a partir de la incertesa del patró d'òxid d'holmi. Partint del supòsit que els valors de la longitud d'ona adopten una distribució rectangular, ja que el certificat no informa del nivell de confiança, ni del factor de cobertura ni de la distribució, la incertesa (u_s) es va calcular:

$$u_s = \frac{0,2}{\sqrt{3}} = 0,115 \text{ nm}$$

- *Coefficient de sensibilitat:*

Es va mesurar per quadruplicat la concentració catalítica de GGT del SCH II a 409, 410 i 411 nm. A la Taula 12 es mostren els resultats obtinguts.

Taula 12. Valors de la concentració catalítica de la GGT segons la longitud d'ona.

λ (nm)	Concentració catalítica ($\mu\text{kat/L}$)				Mitjana
409	2,549	2,599	2,585	2,580	2,578
410	2,500	2,513	2,525	2,527	2,516
411	2,400	2,395	2,411	2,417	2,406

A la Figura 21 es representen les variacions de concentració catalítica en % respecte al valor de la longitud d'ona. A partir de la recta de regressió dels valors de les mitjanes es va obtenir un coeficient de sensibilitat de 3,43 % per nm.

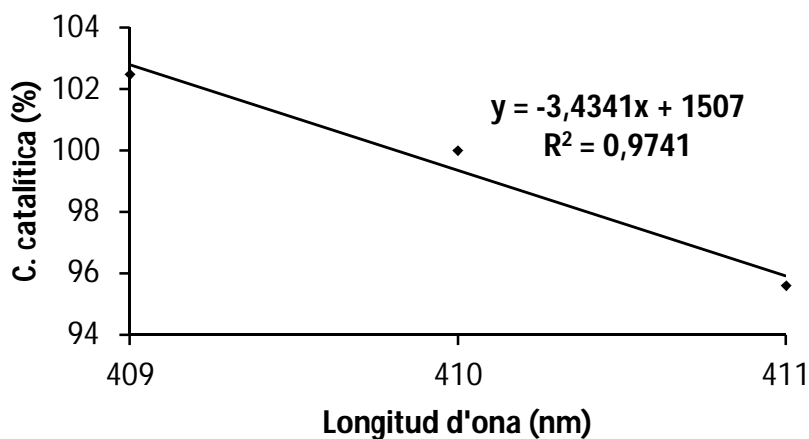


Figura 21. Variació de la concentració catalítica (%) segons la longitud d'ona.

4.1.3.3.2. Exactitud de les absorbàncies

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

La incertesa expandida del resultat de la mesura fotomètrica no ha de superar l'1 % ($k = 2$, per una distribució normal).

- *Incertesa estàndard:*

L'exactitud de les absorbàncies es verifica anualment a 405 nm mitjançant 4 filtres neutres patró calibrats d'absorbàncies distribuïdes entre 0,16 i 2,03. Cadascuna d'aquestes absorbàncies porta associada una incertesa, la qual s'especifica al certificat de calibratge número 93402 (09.05.07) dels filtres (Taula 13).

Taula 13. Incertesa expandida i estàndard associada als valors d'absorbància dels filtres neutres patró calibrats.

Filtre	Absorbància	Incertesa expandida ($k = 2$)	Incertesa estàndard (u_{sf})
1	0,1698	0,0027	0,00135
2	0,5036	0,0027	0,00135
3	1,4392	0,0052	0,00260
4	2,0214	0,0090	0,00450

La incertesa estàndard de l'exactitud de les absorbàncies es va estimar tenint en compte les incerteses dels filtres neutres patró i la imprecisió de l'espectròmetre respecte els valors d'absorbància mesurats anualment des de 2008. Com les lectures d'absorbància en el procediment de mesura de la GGT es realitzen a 410 nm, es va assumir que les incerteses dels filtres i la imprecisió dels valors d'absorbància eren les mateixes que les obtingudes a 405 nm.

La incertesa estàndard de cada filtre es va calcular dividint la incertesa expandida pel seu factor de cobertura $k = 2$.

La incertesa de la imprecisió es va calcular mitjançant l'error estàndard de la mitjana (ds/vn) de les 5 lectures realitzades a cadascun dels filtres (Taula 14).

Taula 14. Valors de l'absorbància obtinguts per cada filtre.

Filtre	Absorbància mesurada				Mitjana	ds/vn
	15.09.08	29.09.09	26.04.10	20.10.11		
1	0,1700	0,1690	0,1680	0,1685	0,169	0,000427
2	0,5080	0,5070	0,5080	0,5090	0,508	0,000408
3	1,4510	1,4570	1,4500	1,4500	1,452	0,001683
4	2,0145	2,0115	2,0130	2,0120	2,013	0,000661

Posteriorment, es va combinar la incertesa estàndard dels filtres (u_{sf}) amb l'error estàndard de la mitjana de cadascun dels filtres, de la forma següent:

$$u_{sf}^2 + \frac{ds^2}{n} = u_{saf}^2$$

D'aquesta manera es va quantificar la incertesa estàndard del valor d'absorbància de cadascun dels filtres expressada en forma de variància. Finalment, es va calcular la incertesa estàndard (u_s) de l'exactitud de les absorbàncies a partir de la mitjana de les incerteses dels 4 valors d'absorbància dels filtres (Taula 15). Es va realitzar un mitjana ja que la mesura de l'activitat catalítica es basa en l'increment d'absorbància en front del temps, per tant es tenen en compte diferents valors numèrics d'absorbància.

Taula 15. Valor de la incertesa estàndard de l'exactitud de les absorptions (u_s).

Filtres	ds/vn	u_{sf}	u_{saf}^2	u_{saf}^2 (%)	
1	0,000427	0,0014	$2,04 \times 10^{-6}$	0,6953	
2	0,000408	0,0014	$1,99 \times 10^{-6}$	0,0784	
3	0,001683	0,0026	$9,59 \times 10^{-6}$	0,0463	
4	0,000661	0,0045	$2,07 \times 10^{-5}$	0,0506	
				0,2177	u_s^2
				0,4666	u_s

- *Coefficient de sensibilitat:*

La concentració catalítica es calcula multiplicant el pendent de la recta, és a dir l'increment d'absorbància dividit entre el temps, per un factor teòric:

$$\text{Concentració catalítica } (\mu\text{kat/L}) = \frac{\Delta Abs}{\Delta t} \times F$$

En aquest cas, el coeficient de sensibilitat prenia un valor igual a 1, perquè les variacions que es produeixen en l'absorbància es tradueixen en canvis en la concentració catalítica de la mateixa proporció que els anteriors.

4.1.3.3.3. Linealitat

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

El pendent de la cinètica enzimàtica ha de ser lineal per poder calcular l'activitat catalítica. És important aclarir que la linealitat d'una recta fa referència al manteniment de les proporcions, és a dir, cada increment de l'eix de les (y) ha de ser sempre el mateix per un determinat increment de l'eix de les (x), tant quan (x) adopti valors numèrics baixos com elevats. En aquest cas l'eix (y) correspon als valors d'absorbància i el eix (x) a la concentració del producte format en la reacció.

- *Incertesa estàndard:*

Anualment es realitza una verificació de la linealitat a 405 nm dels valors d'absorbància de l'espectròmetre. Es van preparar cinc solucions amb diferents concentracions de 4-nitrofenol: 4, 8, 12, 16 i 25 mg/L i es va mesurar l'absorbància de cadascuna d'elles. Els increments d'absorbància entre cada solució s'havien de mantenir constants en funció

dels increments de concentració. A partir d'aquestes dades es van calcular cinc valors de la pendent de la recta en % (el valor del pendent obtingut amb les concentracions de producte més baixes es va considerar del 100 %).

L'espectròmetre calcula el pendent de la cinètica d'una mesura a partir de la mitjana dels pendents obtinguts entre cadascun dels intervals de lectura programats. Per tant, la incertesa estàndard de la linealitat (u_s) es va estimar a partir del càlcul de l'error estàndard de la mitjana dels pendents mitjans, obtinguts en cada verificació realitzada des de 2008 a 2011 (Taula 16). Es va considerar que els valors d'incertesa obtinguts a 405 nm eren els mateixos que a 410 nm.

Taula 16. Valors del pendent (%) per cada verificació. Incertesa estàndard (u_s) de la linealitat.

Interval de concentració	Dia				
	30.09.08	29.09.09	26.04.10	03.01.11	
4-nitrofenol (mg/L)					
0 – 4	100,0	100,0	100,0	100,0	
4 – 8	100,3	100,6	99,3	99,7	
8 – 12	100,4	100,1	99,0	99,9	
12 – 16	100,0	99,3	99,5	100,1	
16 – 25	99,6	99,2	99,2	99,9	u_s (%)
Mitjana (%)	100,1	99,8	99,4	99,9	0,1424

- *Coefficient de sensibilitat:*

El coeficient de sensibilitat per la linealitat prenia un valor igual a 1, ja que les variacions en el pendent de la cinètica enzimàtica es traduïen a canvis d'iguals proporcions en els valors del mesurand.

4.1.3.3.4. *Altres fonts d'incertesa:*

- *Amplada de banda:* el procediment de mesura de referència estableix que aquesta ha de ser ≤ 2 nm. Sempre es va utilitzar una amplada de banda de 2 nm per realitzar les mesures, ja que ve determinada íntegrament per l'espectròmetre. El fabricant de l'equip no proporciona informació sobre el valor de la seva incertesa associada, per tant, no es va poder estimar.

- *Pas de llum*: el procediment de referència indica que ha de ser de $(10,00 \pm 0,01)$ mm. Segons el fabricant de l'equip el pas de llum de l'espectròmetre és de 10 mm i invariable. Per tant, com el valor compleix el requisit i a més a més és invariable la incertesa associada prenia un valor de 0.
- *Temps programats d'incubació i de cinètica*: els temps programats a l'equip (incubació: 60 s i cinètica: 180 s) eren controlats per l'espectròmetre. El cronòmetre intern de l'equip no es va poder calibrar o verificar per la manca de disponibilitat d'un rellotge patró, per tant, no es va poder estimar una incertesa associada a aquest valor. La variació dels valors del mesurand, produïda per aquest factor, es va recollir en el càlcul de la variabilitat en condicions intermèdies del valors del mesurand.
- *Línia base*: és important que l'absorbància base es mantingui al llarg del temps per evitar oscil·lacions dels valors de l'absorbància. Es va mesurar l'absorbància d'una mostra d'aigua destil·lada a 410 nm cada 25 segons durant 12,5 minuts, observant-se una variació de 0,001 unitats d'absorbància en els 12,5 minuts, confirmant-se així l'estabilitat de la línia base. Les possibles variacions dels valors del mesurand que pugui generar l'oscil·lació de l'absorbància es van recollir en el càlcul de la variabilitat en condicions intermèdies del valor del mesurand.

4.1.3.4. Mesures

4.1.3.4.1. Temperatura

- *Requisits del procediment de mesura de referència*:

La temperatura de reacció ha de ser de $(37 \pm 0,1)$ °C per un factor de cobertura, $k = 2$.

- *Incertesa estàndard*:

El termòmetre de sonda per controlar la temperatura de la reacció a la cubeta es calibra anualment. La incertesa estàndard de la temperatura es va estimar a partir de les dades obtingudes del calibratge a 37 °C del certificat número 11/34508459 (juny 2011), on s'especificava una incertesa expandida de 0,06 °C amb un factor de cobertura $k = 2$ per

una distribució normal. Per tant, la incertesa estàndard (u_s) es va calcular dividint la incertesa expandida pel seu factor de cobertura:

$$u_s = \frac{0,06}{2} = 0,03 \text{ } ^\circ\text{C}$$

- *Coefficient de sensibilitat:*

Es va mesurar per triplicat la concentració catalítica de la GGT del SCH II a les següents temperatures: 36,0, 36,5, 37,0, 37,5 i 38,0 °C. Els resultats obtinguts es mostren a la Taula 17.

Taula 17. Valors de la concentració catalítica de la GGT segons la temperatura de mesura.

T (°C)	Concentració catalítica (μkat/L)			Mitjana
36,0	2,418	2,443	2,412	2,424
36,5	2,515	2,500	2,473	2,496
37,0	2,531	2,515	2,522	2,525
37,5	2,568	2,551	2,545	2,555
38,0	2,610	2,579	2,587	2,592

A la Figura 22 es representen els valors de les mitjanes en % en front de la temperatura. Es va obtenir un coeficient de sensibilitat del 3,12 % per grau de temperatura, que representava una variació de 0,079 μkat/L per °C.

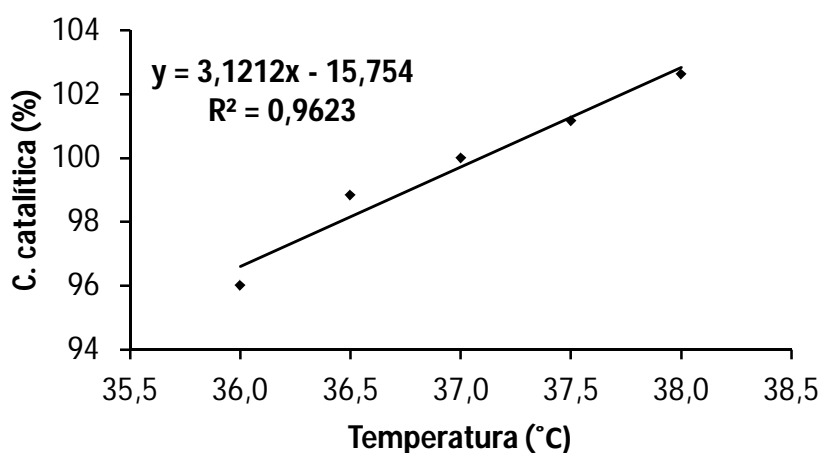


Figura 22. Variació de la concentració catalítica (%) de la GGT segons la temperatura de mesura.

4.1.3.4.2. Fracció de volum de mostra

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

La incertesa expandida de la fracció de volum de mostra ha de ser $\leq 1\%$ per un factor de cobertura, $k = 2$ (tenint en compte una distribució normal).

- *Incertesa estàndard:*

La fracció de volum de mostra (FVm) dispensat a la cubeta de reacció es calcula tenint en compte el volum de mostra (Vm) i el volum total de reactiu i mostra (Vt), amb la fórmula següent:

$$FVm = (Vm) / (Vt)$$

Segons el procediment de mesura, el Vm és 0,25 mL i el Vt és 2,75 mL, que és el sumatori del Vm més els volums de les solucions de reacció (2 mL) i d'inici (0,5 mL). Això dona un $FVm = 0,909$. Aquests volums van ser dispensats amb una pipeta automàtica P-1000, que es verificà cada 3 mesos, obtenint-se així una incertesa associada a cada volum. Per tant, la incertesa estàndard de la FVm es va estimar a partir dels volums dispensats i de les seves incerteses associades, com s'explica a l'apartat 3.2.4.4., mitjançant la fórmula de la FVm .

Es van fer servir les dades de les verificacions dels dies 15.04.10 i 02.07.10, les quals no es diferenciaven de les dades de la resta de les verificacions realitzades. A la Taula 18 es mostren els resultats de la verificació.

Taula 18. Valors de la incertesa expandida (U) i estàndard (u_s) dels volums dispensats amb la pipeta automàtica P-1000.

	Dia verificació	15.04.10		02.07.10	
Solució	Volum (mL)	$U(\%)$ (k=2)	$u_s(\%)$	$U(\%)$ (k=2)	$u_s(\%)$
Mostra	0,25	0,792	0,396	0,649	0,325
Inici	0,50	0,627	0,314	0,745	0,373
Reacció	2 x 1,00	0,869	0,435	0,316	0,158

Primer es va calcular la incertesa estàndard (u_s) del volum total mitjançant la fórmula:

$$u_s(Vt) = \sqrt{us_{Vm}^2 + us_{Vsi}^2 + us_{Vsr}^2}, \text{ d'aquesta manera es van obtenir els resultats:}$$

$$\text{Dia 15.04.10 } u_s(Vt) = \sqrt{0,396^2 + 0,314^2 + (2 \times 0,435)^2} = 0,795 \% \text{ i}$$

$$\text{Dia 02.07.10 } u_s(Vt) = \sqrt{0,325^2 + 0,373^2 + (2 \times 0,158)^2} = 0,542 \%$$

Posteriorment, es va calcular la incertesa estàndard (u_s) de la FVm a partir de l'expressió:

$$u_s(FVm) = FVm * \sqrt{\left(\frac{us_{Vm}}{Vm}\right)^2 + \left(\frac{us_{Vt}}{Vt}\right)^2}$$

Es va obtenir:

$$\text{Dia 15.04.10 } u_s(FVm) = 0,0909 * \sqrt{\left(\frac{0,396}{0,25}\right)^2 + \left(\frac{0,795}{2,75}\right)^2} = 0,1464 \%$$

$$\text{Dia 02.07.10 } u_s(FVm) = 0,0909 * \sqrt{\left(\frac{0,325}{0,25}\right)^2 + \left(\frac{0,542}{2,75}\right)^2} = 0,1194 \%$$

Finalment, el valor de la incertesa estàndard de la FVm es va estimar a partir de la mitjana de les dues $u_s(FVm)$:

$$u_s(FVm) = \sqrt{\left(\frac{0,1464^2 + 0,1194^2}{2}\right)} = 0,1336 \%$$

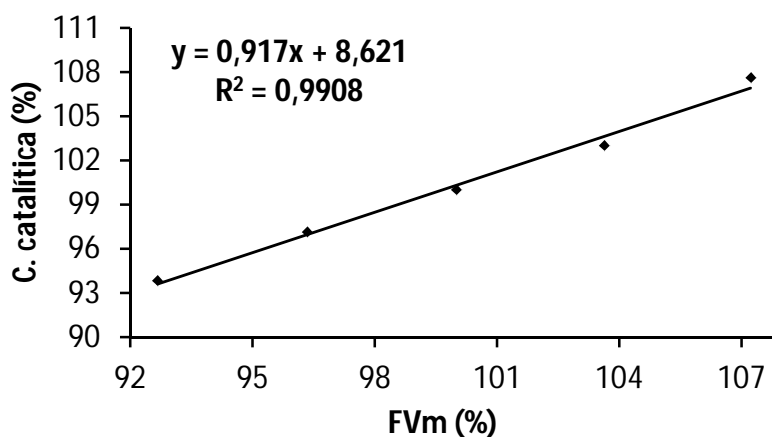
- *Coefficient de sensibilitat:*

Es va modificar la fracció de volum de mostra afegint a la barreja de reacció més o menys quantitat de volum de mostra. El volum de mostra va variar de 0,23 mL a 0,27 mL en intervals de 0,01 mL. Per cadascuna de les condicions anteriors es va mesurar per triplicat el SCH II. A la Taula 19 es mostren els valors de concentració catalítica obtinguts.

Taula 19. Valors de la concentració catalítica de la GGT segons el volum de mostra.

Vm (mL)	FVm (%)	Concentració catalítica ($\mu\text{kat/L}$)			Mitjana
0,23	92,7	2,244	2,257	2,258	2,253
0,24	96,4	2,340	2,324	2,331	2,332
0,25	100,0	2,413	2,397	2,393	2,401
0,26	103,6	2,451	2,480	2,486	2,473
0,27	107,2	2,576	2,589	2,585	2,583

A la Figura 23 es representen els valors de les mitjanes en % de la concentració catalítica de la GGT en front la FVm en %. Es va obtenir un coeficient de sensibilitat del 0,92 % per cada variació de l'1 % de la fracció de volum de mostra.

**Figura 23.** Variació de la concentració catalítica (%) de la GGT segons la fracció de volum de mostra.

4.1.3.4.3. Temps de preincubació

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

Una vegada s'afegeix la mostra a la cubeta de reacció, on ja hi ha els 2 mL de solució de reacció, s'ha de deixar incubar durant 3 minuts per a que la barreja de reacció assoleixi els 37 °C i perquè es reactivi l'enzim. El procediment de mesura no estableix cap requisit sobre la incertesa associada a aquest temps de preincubació.

- *Incertesa estàndard:*

No es va poder estimar la incertesa del valor del temps de preincubació per la manca de disponibilitat d'un rellotge patró per poder calibrar el cronòmetre del laboratori, utilitzat per controlar els 3 minuts.

- *Coefficient de sensibilitat:*

Es va mesurar per quadruplicat la concentració catalítica de la GGT del SCH II per cadascuna de les quatre variables del temps de preincubació 1, 2, 3 i 4 minuts. Els resultats obtinguts es mostren en la Taula 20. Els resultats no mostren canvis significatius en els valors del mesurand segons el temps de preincubació. Es van obtenir uns valors de $p = 0,88$ en una anàlisi ANOVA ($\alpha = 0,05$), pel que es va assumir que el coeficient de sensibilitat era igual a 0.

Taula 20. Valors de la concentració catalítica de la GGT segons el temps de preincubació.

Temps (min)	Concentració catalítica ($\mu\text{kat/L}$)				Mitjana
1	2,534	2,506	2,515	2,530	2,521
2	2,488	2,526	2,552	2,552	2,530
3	2,539	2,511	2,516	2,526	2,523
4	2,542	2,517	2,517	2,543	2,530

4.1.3.4.4. *Cubetes*

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

El volum de la barreja final de reacció és de 2,75 mL, per tant, es van utilitzar cubetes mida macro de vidre amb una capacitat de 3,5 mL.

- *Incertesa estàndard:*

Donat que sempre es va utilitzar el mateix model de cubeta per fer les mesures, les variacions que es puguin generar estan incloses dins del factor d'incertesa de la variabilitat en condicions intermèdies de mesura. Així doncs, es van descartar les cubetes com a font individual en la contribució a la incertesa de mesura.

Es va realitzar un experiment comparant el resultat de la concentració catalítica de la GGT del material SCH II utilitzant cubetes mida macro, tal i com especifica el procediment de mesura, i cubetes mida micro, amb capacitat de volum d'1,4 mL. En aquest cas, es va dispensar la meitat del volum de la barreja final de reacció, però es va mantenir la proporció entre el volum de mostra i el volum de reactius. Es va mesurar per quadruplicat la concentració catalítica de la GGT del SCH II per cadascuna de les condicions: cubeta mida macro i volum de la barreja final de reacció de 2,75 mL, cubeta mida macro i volum de 1,38 mL i cubeta mida micro i volum de 1,38 mL.

Els resultats de la Taula 21 mostren diferències significatives, amb una $p = 0,001$ en una anàlisi ANOVA amb contrast *Scheffé* ($\alpha = 0,05$), entre els valors de concentració catalítica obtinguts al utilitzar la cubeta mida macro i el volum 2,75 mL i els obtinguts fent servir tant la cubeta mida macro i el volum 1,38 mL com la cubeta mida micro. Així doncs, el volum final de la barreja de reacció va influir en la concentració catalítica de l'enzim independentment de la mida de la cubeta utilitzada.

Taula 21. Valors de la concentració catalítica de la GGT segons la cubeta utilitzada i el volum de la barreja de reacció dispensat.

Cubeta	Volum	Concentració catalítica ($\mu\text{kat/L}$)				Mitjana
Macro	2,75	2,539	2,526	2,511	2,516	2,523
Macro	1,38	2,566	2,565	2,550	2,569	2,562
Micro	1,38	2,556	2,538	2,543	2,539	2,544

4.1.3.5. Factors de correcció

4.1.3.5.1. *Blanc de reactiu*

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

El valor del blanc de reactiu ha de ser inferior a $1,7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ($0,023 \mu\text{kat/L}$) i s'ha de restar del valor obtingut per cada mostra.

- *Incertesa estàndard:*

En el cas del blanc de reactiu, es va considerar que una correcció realitzada amb un únic valor numèric per totes les mesures realitzades no tenia cap incertesa associada.

Es va realitzar un estudi per estimar la variabilitat dels valors del blanc de reactiu obtinguts amb el procediment de mesura de referència. Es van realitzar tres mesures del blanc de reactiu en quatre sèries independents. Els valors dels resultats obtinguts es mostren en la Taula 22.

Taula 22. Valors de la concentració catalítica de la GGT del blanc de reactiu.

Sèrie	Concentració catalítica BR ($\mu\text{kat/L}$)			Mitjana
1	0,0036	0,0049	0,0101	0,0062
2	0,0023	0,0117	0,0051	0,0064
3	0,0060	0,0046	0,0095	0,0067
4	0,0093	-0,0031	0,0083	0,0058

Aquests resultats mostren que la variació entre els valors del blanc de reactiu era elevada, es va obtenir un CV del 56 % (el valor negatiu es va considerar com a 0). Però, si es considerava només la variació entre les mitjanes de cada sèrie, s'obtenia un CV = 5,3 %. Per tant, es decidí fer les mesures del blanc de reactiu per duplicat en cada sèrie analítica i utilitzar la mitjana de les mesures del blanc per corregir el valor de l'activitat de les mostres.

4.1.3.5.2. *Massa de l'aigua de reconstitució del liofilitzat*

- *Requisit del procediment de mesura de referència:*

La reconstitució de les mostres liofilitzades es va realitzar per pesada. Es considerà l'aigua com a reactiu, i es va establir una incertesa per al valor de la massa de l'aigua igual a la incertesa del valor de la massa del reactiu en cada pesada, $\leq 1\%$ ($k = 2$, interval de confiança del 95 %).

- *Incertesa estàndard:*

Les mostres liofilitzades es van reconstituir per pesada amb el volum que indica el fabricant dels materials. El valor de la massa d'aigua tenia una incertesa deguda a la balança, especificada al certificat de calibratge número 09/34513862 (novembre 2009) de la balança analítica. Per mostres de 5 mL, el que corresponia a 5 g de massa, la incertesa expandida amb un factor de cobertura, $k = 2$, era de 0,0026 % i per mostres d'1 mL, el que corresponia a 1 g de massa, de 0,013 %. L'experiència ens indicava que aquestes variacions produïen canvis no significatius als valors del mesurand, per tant, es va descartar la incertesa generada per la massa de l'aigua de reconstitució en la contribució a la incertesa de mesura. Sí que es van corregir els resultats de concentració catalítica mesurats per la desviació del volum de l'aigua de reconstitució indicat pel fabricant, utilitzant el factor: $F = \text{massa } H_2O / \text{volum mostra}$.

4.1.3.5.3. Volum dispensat

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

A partir del requisit de l'apartat 4.1.3.4.2, es van establir els requisits per a la verificació dels volums dispensats per les pipetes automàtiques: la incertesa expandida de cada volum ha de ser $\leq 1\%$ ($k = 2$), i l'error sistemàtic per cada volum dispensats ha de ser $\leq 1\%$. Com a norma un error sistemàtic conegut ha de ser corregit, sempre que sigui possible.

- *Incertesa estàndard:*

La incertesa estàndard dels volums dispensats a la barreja de reacció ja es va tenir en compte com a font d'incertesa en l'estudi de la fracció de volum de mostra. L'error sistemàtic del volum dispensat es va corregir, tot i que es complís amb el requisit. Així doncs, es va considerar que la incertesa estàndard del factor de correcció era la mateixa incertesa que la deguda al propi error sistemàtic (59).

La incertesa estàndard ($u_s(es)$) deguda al factor de correcció de l'error sistemàtic dels volums dispensats es va estimar fent servir el mateix model que a l'apartat 4.1.3.4.2. La incertesa del factor de correcció de l'error sistemàtic per cadascun dels volums dispensats es va estimar amb les dades de la verificació de la pipeta P-1000 del dia 02.07.10 (els valors varien lleugerament entre verificacions). Per cada volum dispensat es van realitzar

deu pesades diferents. Després es va calcular l'error sistemàtic de cadascuna d'elles i es va estimar la incertesa de l'error sistemàtic de cada volum (u_{ses}) a partir de l'error estàndard de la mitjana (Taula 23).

Taula 23. Valors de l'error sistemàtic i de la incertesa estàndard de l'error sistemàtic (u_{ses}) de cada volum dispensat.

Volums (mL)	1,00	0,50	0,25
Error sistemàtic (%)	0,65	-0,12	-0,92
	0,88	-0,14	-0,56
	0,73	0,38	-0,44
	0,52	-0,68	-0,76
	0,80	-0,20	-0,52
	0,68	0,20	-0,68
	0,79	-0,14	-0,80
	0,42	0,08	-1,16
	0,56	0,14	-0,88
	0,54	0,60	-0,48
ds (%)	0,146	0,353	0,229
$u_{ses}: ds/\sqrt{n}$	0,046	0,112	0,072

Es va calcular la incertesa de l'error sistemàtic del volum total de la manera següent:

$$u_{ses}(Vt) = \sqrt{0,072^2 + 0,112^2 + (2 \times 0,046)^2} = 0,148 \% ,$$

i finalment, es va obtenir l'estimació de la incertesa estàndard ($u_s(es)$) deguda al factor de correcció de l'error sistemàtic dels volums dispensats a la *FVm* segons el càlcul:

$$u_s(es) = 0,091 * \sqrt{\left(\frac{0,072}{0,25}\right)^2 + \left(\frac{0,148}{2,75}\right)^2} = 0,026 \%$$

4.1.3.5.4. Densitat de l'aigua de reconstitució dels liofilitzats

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

Les mostres liofilitzades es van reconstituir amb aigua destil·lada a una temperatura de $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

- *Incertesa estàndard:*

El canvi de densitat de l'aigua provocat per una variació d' $1 ^\circ\text{C}$ és de $0,0002 \text{ g/mL}$. Per exemple, una mostra liofilitzada reconstituïda amb 5 mL d'aigua presentà una variació de la massa de la seva pesada del: $5 \text{ mL} \times 1 ^\circ\text{C} \times 0,0002 \text{ g/mL} = 0,001 \text{ g}$, el que va comportar una variació en la concentració catalítica de la mostra del $0,02 \%$. Per tant, es va considerar que es podia descartar la seva contribució a la incertesa de mesura.

4.1.3.6. Processament de les dades

4.1.3.6.1. Arrodoniment

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

No n'hi ha.

- *Incertesa estàndard:*

L'espectròmetre dona els resultats de concentració catalítica en U/L i amb tres decimals. Es van mantenir tots els decimals alhora de realitzar les correccions i de passar els valors a $\mu\text{kat/L}$. Aleshores, els valors de concentració catalítica no arrossegueu errors degut a l'arrodoniment, ja que s'arrodoneixen els valors a tres xifres significatives en el moment de preparar l'informe de resultats. L'arrodoniment es feia: quan el valor era < 5 es deixava igual, i quan era ≥ 5 es passava al dígit superior. Es va decidir descartar l'arrodoniment com a font d'incertesa.

4.1.3.6.2. Valors aberrants

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

El coeficient de variació dels triplicats o quadruplicats de les mesures de concentració catalítica ha de ser $\leq 1,5 \%$.

- *Incertesa estàndard:*

Mesurar el valor de concentració catalítica d'una mostra mitjançant un triplicat o quadruplicat amb una variabilitat determinada ($CV \leq 1,5 \%$) ajuda a detectar possibles valors aberrants. Si hi ha un valor aberrant en el replicat s'observa, per una banda perquè el seu valor numèric és molt diferent als de la resta dels valors del replicat, i per l'altra, perquè això genera que el CV de la mitjana dels valors del replicat superi el 1,5 %. Sempre que s'obtenia una mitjana d'un triplicat o quadruplicat amb un $CV > 1,5 \%$ es tornava a repetir les mesures. L'origen d'aquesta elevada variabilitat era, en la major part dels casos, deguda als errors comesos en el pipeteig manual. D'aquesta manera, la font d'incertesa de valors aberrants quedava exclosa com a tal, ja que els valors aberrants eren eliminats i no es van considerar per calcular les mitjanes de concentració catalítica.

4.1.3.6.3. Coeficient d'absorció molar

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

El coeficient d'absorció molar del 5-amino-2-nitrobenzoat a 410 nm i 37 °C és 796 m^2/mol .

- *Incertesa estàndard:*

El calibratge del procediment de mesura de referència es realitza mitjançant un factor amb valor teòric. Aquest factor té en compte la fracció de volum de mostra, la longitud de la cubeta i el coeficient d'absorció molar. El primer i el segon components ja s'han discutit com a fonts d'incertesa.

El coeficient d'absorció molar, en aquest cas, és l'absorbància d'una solució d'1 mol/L de 5-amino-2-nitrobenzoata 410 nm i tenint en compte les condicions de mesura del procediment. El valor (796 m^2/mol) descrit en el procediment de referència es va obtenir en condicions experimentals, però els autors no informen de la desviació dels valors del coeficient ni de la incertesa associada. Així doncs, no es va poder estimar la contribució a la incertesa de mesura per falta d'informació.

4.1.3.7. Variabilitat: imprecisió en condicions intermèdies

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

Habitualment, les mostres es valoren mesurant per triplicat la concentració catalítica de l'enzim en tres dies o sèries diferents, i utilitzant un nou vial de mostra cada dia ($n = 9$). La imprecisió en condicions intermèdies de la mesura de la concentració catalítica de la GGT es va calcular a partir del CV obtingut de les mitjanes dels resultats de cadascun dels tres dies, com es representa a la Figura 24. Segons els requisits del LREC s'accepta un CV interdiari $\leq 2,1$ %.

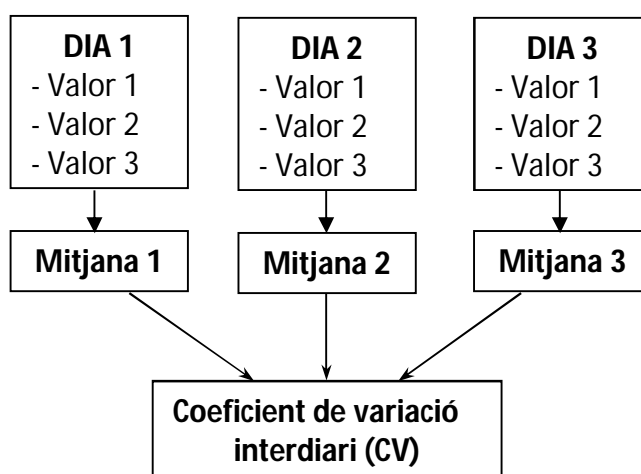


Figura 24. Disseny de la valoració d'una mostra. Obtenció del coeficient de variació interdiari.

- *Incertesa estàndard:*

Es van recopilar tots els resultats dels assaigs realitzats al LREC del novembre del 2008 fins l'abril del 2011, i es va obtenir el CV interdiari (variació entre els diferents dies que es mesura una mateixa mostra) per cadascuna de les mostres valorades ($n = 19$). El CV interdiari es calcula a partir de la desviació estàndard de les tres mitjanes dels triplicats (una mitjana per dia) i la mitjana de les tres mitjanes. Per obtenir la incertesa estàndard es va realitzar una mitjana de tots els valors dels CV (en forma de variància) i es va dividir per $\sqrt{3}$, ja que els CV s'obtenien de les tres mitjanes diàries. Així doncs, la $u_s = 0,673$ %.

- *Coeficient de sensibilitat:*

El coeficient de sensibilitat es va considerar 1, ja que la incertesa estàndard es va obtenir a partir dels resultats de les mesures de concentració catalítica de la GGT.

4.1.3.8. Tractament de les mostres

4.1.3.8.1. *Temperatura de l'aigua de reconstitució del liofilitzat*

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

Es va decidir reconstituir les mostres liofilitzades amb aigua destil·lada a una temperatura de $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

- *Incertesa estàndard:*

La incertesa estàndard de la temperatura de l'aigua es va estimar tenint en compte l'interval del requisit ($1 ^\circ\text{C}$). L'interval $\pm 1 ^\circ\text{C}$ es va considerar el valor de la incertesa expandida i es va suposar una distribució rectangular dels valors que prenien la temperatura de l'aigua de reconstitució. Per tant, la incertesa estàndard es va calcular:

$$u_s = 1/\sqrt{3} = 0,577 ^\circ\text{C}$$

- *Coeficient de sensibilitat:*

Es van utilitzar com a mostres els materials SCH II i SCB II que tenen diferent matriu sèrica, una humana i l'altra bovina, respectivament, per comprovar si la temperatura de l'aigua de reconstitució influïa en la concentració catalítica de la GGT. Es van reconstituir tres vials de cadascuna dels materials amb aigua destil·lada a 15, 20 i 25 $^\circ\text{C}$, i es va mesurar per quadruplicat la concentració catalítica de tots sis vials. A la Taula 24 es mostren els resultats obtinguts.

Taula 24. Valors de la concentració catalítica de la GGT segons la temperatura de l'aigua de reconstitució del liofilitzat.

T °C	SCH II					SCB II				
	Concentració catalítica (μkat/L)				Mitjana	Concentració catalítica (μkat/L)				Mitjana
15	2,538	2,527	2,526	2,511	2,526	3,857	3,867	3,934	3,923	3,895
20	2,508	2,509	2,512	2,513	2,510	3,873	3,862	3,865	3,896	3,874
25	2,509	2,506	2,505	2,506	2,506	3,852	3,844	3,852	3,862	3,853

A la Figura 25 es representen les mitjanes de concentració catalítica en % en front de la temperatura de l'aigua de reconstitució del liofilitzat. Es va observar una lleugera disminució de la concentració catalítica al augmentar la temperatura de l'aigua de reconstitució, generant un coeficient de sensibilitat d'aproximadament 0,09 % per °C (es va fer una mitjana dels dos valors de coeficient de sensibilitat obtinguts per cada mostra).

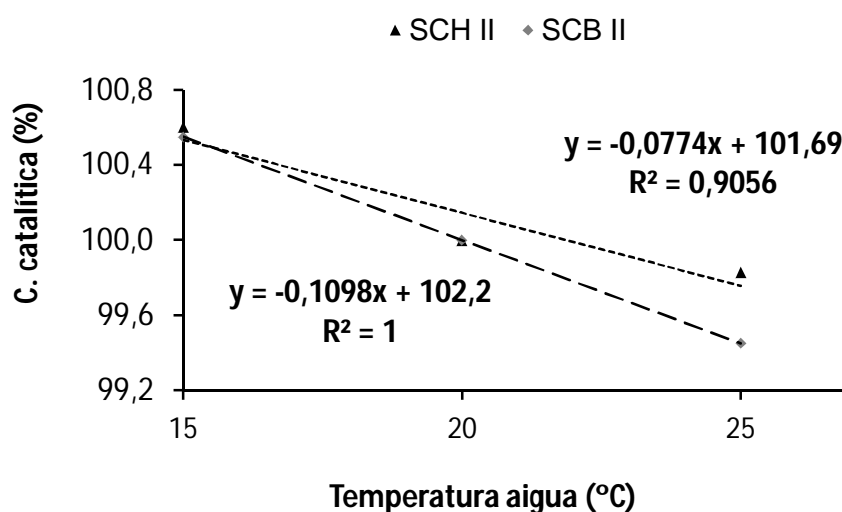


Figura 25. Variació de la concentració catalítica (%) de la GGT segons la temperatura de l'aigua de reconstitució del liofilitzat.

4.1.3.8.2. Temps i temperatura durant la reconstitució

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

Es va establir un temps de reconstitució del liofilitzat d'1 hora, els primers 30 minuts la mostra es mantenia a temperatura ambient i els altres 30 minuts a 4 °C. Les mostres que es mesuraven immediatament després de la seva reconstitució es mantien durant tota l'hora a temperatura ambient.

- *Incertesa estàndard:*

Per conèixer la incertesa deguda als factors temperatura a la que la mostra es reconstitueix i temps necessari per a que es reconstitueixi el liofilitzat, és necessari saber com afecten aquests dos paràmetres a la concentració catalítica de la GGT. La reconstitució és el temps des de que es vessa l'aigua destil·lada al vial de la mostra fins que la mostra es mesurada. Així doncs, es van utilitzar quatre vials diferents d'una mateixa mostra (SCH II) i es van sotmetre a les condicions:

- A) Temps de reconstitució de 30 minuts a una temperatura de 4 °C.
- B) Temps de reconstitució de 30 minuts a una temperatura de 25 °C.
- C) Temps de reconstitució d'1 hora a una temperatura de 4 °C.
- D) Temps de reconstitució d'1 hora a una temperatura de 25 °C.

A la Taula 25 es mostren els resultats dels quadruplicats de la concentració catalítica de la GGT de les mesures realitzades per a cadascun dels vials.

Taula 25. Valors de la concentració catalítica de la GGT segons el temps i la temperatura de reconstitució del liofilitzat.

Condicció	Concentració catalítica ($\mu\text{kat/L}$)				Mitjana
A	2,495	2,504	2,496	2,536	2,508
B	2,515	2,537	2,529	2,532	2,528
C	2,494	2,498	2,529	2,530	2,513
D	2,527	2,531	2,514	2,528	2,525

Tot i que es van observar valors de concentració catalítica una mica més elevats en la reconstitució de les mostres a 25 °C, aquests no van ser significatius, amb una $p = 0,22$ per una anàlisi ANOVA ($\alpha = 0,05$). Per tant, es descarta la contribució d'aquests factors a la incertesa de mesura.

4.1.3.8.3. *Blanc de mostra*

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

El blanc de mostra es mesura i es registra però no es té en compte alhora de realitzar els càlculs per obtenir el valor de concentració catalítica de la mostra. La seva informació és important per conèixer l'existència d'interferents a la mostra. Com indica el procediment de mesura de referència, si la concentració catalítica del blanc de mostra és > 1 % del total de la concentració de la pròpia mostra, aquesta mostra no pot ser utilitzada com a material de calibratge.

- *Incertesa de mesura:*

El blanc de mostra com a font d'incertesa no es va tenir en compte en l'estimació de la incertesa de mesura, ja que no va intervenir en el càlcul dels valors de concentració catalítica del mesurand. Només es va mesurar per obtenir informació de l'existència d'interferents i en cap dels casos es van obtenir valors > 1 % del total de la concentració catalítica.

4.1.3.8.4. *Dilució de les mostres*

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

Totes aquelles mostres amb un increment d'absorbància > 0,0033 s⁻¹ (concentració catalítica > 4,56 µkat/L), s'han de diluir amb solució salina (NaCl 9 g/L). Es pot fer una dilució 1:2 i si fos necessari una 1:4, però mai s'ha de sobrepassar aquesta dilució. El valor obtingut de la mesura de concentració catalítica s'ha de multiplicar pel factor de dilució corresponent.

- *Incertesa de mesura:*

Per estimar la incertesa de mesura de la dilució de la mostra es va considerar: a) el mateix volum de mostra per totes les dilucions realitzades (1 mL), i b) que la incertesa de cada volum dispensat era d'1 % (k = 2) (segons el requisit de l'apartat 4.1.3.5.3).

D'aquesta manera, la fracció de mostra de la dilució es va veure afectada principalment pel volum de solució diluent, ja que el volum de mostra sempre era el mateix. Per tant, quan més diluïda estava la mostra, més quantitat de solució salina es necessitava i més elevada era la incertesa de la dilució de la mostra. A la Taula 26 es pot

veure la incertesa estàndard associada a cadascun dels factors de dilució de la mostra, la qual es va estimar calculant el 0,5 % (1 % /2) del volum dispensat de solució salina.

Taula 26. Incertesa estàndard del factor de dilució de la mostra.

V.mostra (mL)	V.total (mL)	Incertesa estàndard (mL)
1	1,1	0,0005
1	1,5	0,0025
1	2,0	0,005
1	4,0	0,015
1	6,0	0,025

- *Coefficient de sensibilitat:*

Es va mesurar la concentració catalítica per quadruplicat de les mostres SCH II, SCB II i de les seves respectives dilucions 1:2 i 1:4. Les dilucions es van realitzar utilitzant com diluent tant solució salina (SS), com especificava el procediment de referència, com solució diluent d'enzims (Sde) (igual a la salina però contenint a més 12,24 g/L d'albumina de sèrum boví). A la Taula 27 es mostren els resultats obtinguts per cada factor de dilució.

Taula 27. Valors de la concentració catalítica de la GGT segons el factor de dilució de la mostra.

Dilucions	SCH II					SCB II				
	Concentració catalítica (µkat/L)				Mitjana	Concentració catalítica (µkat/L)				Mitjana
1	2,459	2,499	2,520	2,523	2,500	3,873	3,862	3,865	3,896	3,874
1:2 SS	2,480	2,454	2,500	2,492	2,476	3,850	3,860	3,926	3,906	3,886
1:2 Sde	2,466	2,512	2,532	2,516	2,506	3,776	3,832	3,874	3,880	3,841
1:4 SS	2,480	2,500	2,492	2,532	2,500	3,984	3,988	3,984	3,988	3,986*
1:4 Sde	2,492	2,480	2,484	2,524	2,496	3,864	3,900	3,880	3,940	3,896

Segons una anàlisi ANOVA amb contrast *Scheffé* ($\alpha = 0,05$) els valors de concentració catalítica observats no eren significativament diferents entre ells, obtenint una $p = 0,66$ per el SCH i $p = 0,18$ per el SCB. A excepció del valor de la dilució 1:4 SS per la mostra SCB II (*) que donava un valor més elevat ($p = 0,15 \times 10^{-3}$).

4.1.3.9. Estabilitat de l'enzim GGT a les mostres

Es va mesurar la concentració catalítica de la GGT per triplicat de les mostres SCH II, SCB I i RELA B als 30 minuts i a les 2, 6, 24 i 48 hores després de la reconstitució del liofilitzat. Les mostres es van reconstituir amb aigua destil·lada a $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$ i es van mantenir 30 minuts a temperatura ambient i la resta de temps a $4 ^\circ\text{C}$. Es va utilitzar un únic vial per mostra. La Figura 26 mostra els resultats obtinguts de les mitjanes dels triplicats, en unitats de concentració catalítica en % respecte al valor de 30 minuts. S'observa un comportament semblant de la GGT dels dos materials SCB I i RELA B, en el que la concentració catalítica augmentava a les 24 hores en un 2 % i un 2,4 %, respectivament, i a partir del tercer dia la concentració catalítica tendia a disminuir en un 1 % i un 2,5 %, respectivament. Per altra banda, es veia que la GGT del SCH II era més estable ja que la concentració catalítica augmentava, únicament, en un 1 %, si s'exceptuava la disminució d'un 1,2 % a les 2 hores després de la reconstitució del liofilitzat.

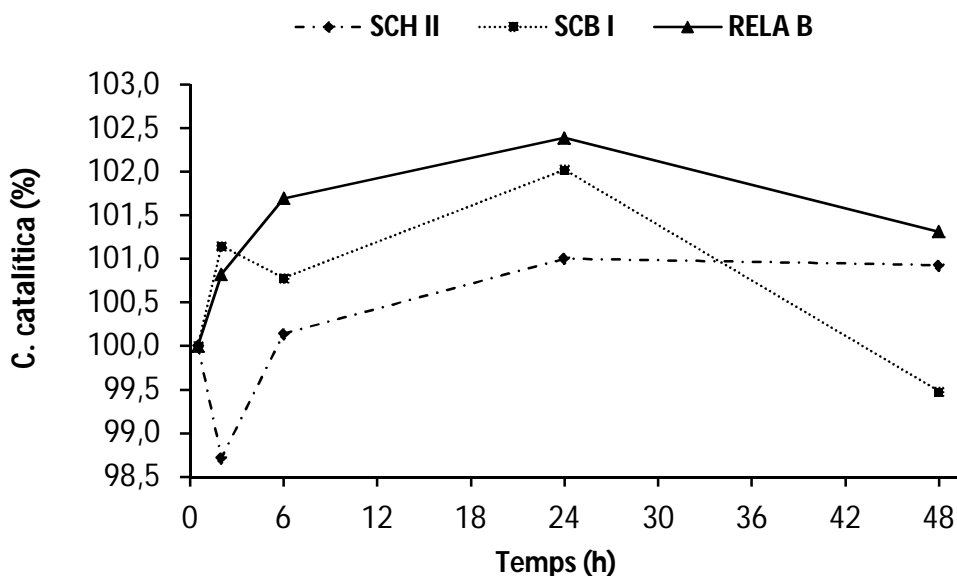


Figura 26. Estabilitat de la GGT en diferents mostres liofilitzades.

Es va estimar la incertesa de mesura deguda a l'estabilitat de les mostres tenint en compte que, normalment, al laboratori les mostres es mesuren en un interval de 0 a 3 hores després de la seva reconstitució, i la variabilitat de la concentració catalítica de la GGT per hora. S'estima una incertesa estàndard (u_s) del temps de mesura de la mostra, considerant una distribució rectangular, de:

$$u_s = \frac{(3 - 0)}{2 \times \sqrt{3}} = 0,866 \text{ hores}$$

La variabilitat de la concentració catalítica de la GGT per cada mostra es va calcular a partir de l'increment de concentració catalítica entre els 30 minuts i les 6 hores dividit pel temps total (5,5 hores). Els valors de variabilitat de la concentració catalítica per hora obtinguts van ser: 0,254 % per el SCH II, 0,200 % per el SCB I i 0,309 % per el RELA B. La contribució de l'estabilitat de les mostres a la incertesa de mesura es va calcular multiplicant la incertesa estàndard (u_s) del temps de mesura per la variabilitat de la concentració catalítica de cada material, obtenint-se uns valors d'incertesa estàndard de 0,220 % per el SCH II, 0,170 % per el SCB i 0,268 % per el RELA B.

4.1.4. Estimació de la incertesa combinada

Una vegada estudiades totes les possibles fonts d'incertesa, i coneguts els valors de la incertesa estàndard i dels coeficients de sensibilitat de cadascuna d'elles, es va procedir a combinar-les per estimar la incertesa combinada, com es descriu a l'apartat 3.2.4 de Materials i Mètodes.

Es va valorar si les fonts que contribuïen a la incertesa de mesura eren o no independents entre elles. En el cas del procediment de mesura de la GGT es coneix una dependència entre el pH i la temperatura. La variació dels valors d'una de les magnituds produïa canvis en els valors de l'altra, per tant, es va utilitzar la fórmula de l'apartat 3.2.4.3 per estimar la incertesa combinada. La contribució a la incertesa de mesura de la correlació entre el pH i la temperatura es va calcular separatament de la següent manera:

$$\text{Correlació (pH, } T^{\circ}\text{C)} = 2 \cdot cs_{pH} \cdot cs_{T^{\circ}\text{C}} \cdot u_s(x_{pH}) \cdot u_s(x_{T^{\circ}\text{C}}) \cdot r(x_{pH}, x_{T^{\circ}\text{C}})$$

Primer es va obtenir el coeficient de correlació (r) a partir dels valors de la taula, "Dependència del pH de la solució de reacció amb la temperatura" del procediment de mesura de referència pàgina 5, PNT-005 (Annex 1), obtenint-se un valor de -0,99976. El valor de la correlació va ser:

$$\text{Correlació (pH, } T^{\circ}\text{C)} = 2 \cdot 19,1 \% \cdot 3,12 \% \cdot 0,01 \text{ pH} \cdot 0,03 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot -0,99976 = -0,0358$$

La Taula 28 mostra els valors d'incertesa estàndard (u_s) i els coeficients de sensibilitat (cs) que es van obtenir per cadascuna de les fonts d'incertesa estudiades. S'observa la contribució a la incertesa de mesura de cada font, obtinguda a partir de la multiplicació de la (u_s) pel seu (cs) corresponent. També es mostra el valor de la correlació entre el pH i la temperatura. El sumatori de totes les contribucions va generar una incertesa combinada pel valor de concentració catalítica de la GGT de l'1,10 %.

La incertesa de mesura deguda al tractament de les mostres no es va tenir en compte en el càlcul de la incertesa de mesura, ja que aquesta variava segons el tipus de mostra mesurada. En aquest cas, es va fer l'excepció de la incertesa deguda a la temperatura de l'aigua de reconstitució del liofilitzat, que si que es va incloure, tot i que la seva contribució era molt petita. És important tenir en compte que el tractament de les mostres pot generar una contribució important a la incertesa de mesura. A la Taula 29 s'observa com influeix la contribució de l'estabilitat de les mostres en la incertesa combinada. Així doncs, una manera de reduir el seu efecte és estandarditzar al màxim el procés del tractament de les mostres.

Taula 28. Nous valors de la incertesa combinada de la mesura de la GGT tenint en compte la contribució (u) de l'estabilitat de diferents materials comercials.

Mostra	Contribució u (%)	Incertesa combinada (%)
SCH II	0,220	1,12
SCB I	0,170	1,11
RELA B	0,268	1,13

Taula 29. Dades de l'estudi de la compilació de la incertesa del procediment de mesura de referència primari de la GGT. Es mostra la incertesa estàndard (u_s), el coeficient de sensibilitat (cs) i la contribució a la incertesa de mesura (u) per cadascuna de les fonts d'incertesa, i la incertesa combinada del procediment de mesura (uc). (ES) representa l'error sistemàtic.

Fonts d'incertesa	Valor	Unitat	Tipus	Origen	u_s	cs	Contribució u	Var (u^2)	
Variabilitat (c. intermèdies)	2,10	%	A	Experimental	0,6733	1,00	0,6733	0,4534	
Interferent (glicina)	0,15	%	B	Certificat	0,0433	12,4	0,5388	0,2903	
Interferent (5-amino-2-nitrobenzoat)	0,10	%	B	Certificat	0,0289	2,92	0,0843	0,0071	
Exactitud de les absorbàncies	0,50	Abs	A i B	Certificat +	0,4666	1,00	0,4666	0,2177	
Longitud d'ona	410	nm	B	Certificat del patró	0,1155	3,43	0,3965	0,1572	
pH	7,70	pH	B	Certificat del patró	0,0173	19,1	0,3310	0,1096	
Linealitat	100	%	A	Verificació	0,1424	1,00	0,1424	0,0203	
Fracció de volum de mostra	9,09	%	B	Calibratge	0,1336	0,92	0,1225	0,0150	
Temperatura	37,0	°C	B	Calibratge	0,0300	3,12	0,0936	0,0088	
Temperatura de l'aigua de	20,0	°C	B	Requisit IFCC	0,5774	0,09	0,0539	0,0029	
Arrasament	SR-100	mL	B	Certificat	0,0210	0,00	0,0000	0,0000	
	SI-20	mL	B	Certificat	0,0405	0,00	0,0000	0,0000	
Massa dels reactius	SR-2,73	g	B	Calibratge	0,0024	0,00	0,0000	0,0000	
	SI-0,217	g	B	Calibratge	0,0276	0,00	0,0000	0,0000	
Volums dispensats (ES)		%	A	Calibratge	0,0267	1,00	0,0267	0,0007	
Massa de l'aigua de reconstitució	5	mL	B	Calibratge	$6,5 \cdot 10^{-7}$	1,00	0,0001	0,0000	
Correlació entre pH i temperatura								-0,0358	
								1,10	uc (%)

4.1.5. Estimació de la incertesa expandida

La incertesa expandida dels valors obtinguts de la mesura de la concentració catalítica de la GGT mitjançant el procediment de mesura de referència es va estimar a partir de la incertesa combinada i d'un factor de cobertura.

El factor de cobertura ve determinat per la distribució de probabilitats i pels graus de llibertat.

- *Distribució de probabilitats*: es va suposar que els valors de la concentració catalítica es distribuïen normalment. Es va realitzar el test de normalitat pels valors de les mostres SCH II (n = 56) i el material de referència de GGT (n = 43), obtenint-se unes probabilitats de 0,72 i 0,05, respectivament, per un nivell de confiança del 95 %.
- *Graus de llibertat*: per les fonts d'incertesa amb més contribució a la incertesa de mesura es van estimar els graus de llibertat (ν) com es descriu a l'apartat 3.2.5 de Materials i Mètodes. Es va utilitzar la fórmula de *Welch-Satterthwaite* per obtenir els graus de llibertat efectius (ν_{eff}). Els ν_{eff} calculats van ser 31.

Si la distribució dels valors de la concentració catalítica era normal, els graus de llibertat eren > 20 per un nivell de confiança del 95 %, el factor de cobertura utilitzat va ser $k = 2$. Per tant, la incertesa expandida (U) es va estimar:

$$U = 2 \times 1,10 = 2,20 \%$$

L'estimació de la incertesa expandida del procediment de mesura de referència de la GGT es resumeix a la Taula 30, on únicament es mostren les fonts d'incertesa que tenen una contribució significativa a la incertesa de mesura, juntament amb els seus graus de llibertat.

Taula 30. Fonts d'incertesa amb una contribució significativa a la incertesa de mesura del procediment de mesura de l'enzim GGT. Es mostra els graus de llibertat (ν), la incertesa estàndard (u_s), el coeficient de sensibilitat (cs) i la contribució a la incertesa de mesura (u) per cadascuna de les fonts d'incertesa, la incertesa combinada (uc) i la incertesa expandida (U) del procediment de mesura i els graus de llibertat efectius (ν_{eff}).

Fonts d'incertesa	Valor	Unitat	Tipus	Origen	ν	u_s	cs (%)	Contribució u (%)	Var (u^2) (%)	
Variabilitat (c. intermèdies)	2,10	%	A	Experimental	18	0,6733	1,00	0,6733	0,4534	
Interferent (glicina)	0,15	%	B	Certificat	-	0,0433	12,4	0,5388	0,2903	
Exactitud de les absorbàncies	0,50	Abs	A i B	Certificat + verificació	4	0,4666	1,00	0,4666	0,2177	
Longitud d'ona	410	nm	B	Certificat del patró	10	0,1155	3,43	0,3965	0,1572	
pH	7,70	pH	B	Certificat del patró	10	0,0173	19,1	0,3310	0,1096	
Linealitat	100	%	A	Verificació	3	0,1424	1,00	0,1424	0,0203	
Fracció de volum de mostra	9,09	%	B	Calibratge	12	0,1336	0,92	0,1225	0,0150	
Temperatura	37,0	°C	B	Calibratge	10	0,0300	3,12	0,0936	0,0088	
Correlació entre pH i temperatura									-0,0358	
									1,10	uc (%)
									2,20	U (%) ($k = 2$)
									31	ν_{eff}

4.2. Creatina cinasa

4.2.1. Definició del mesurand

El mesurand es defineix com la concentració catalítica ($\mu\text{kat/L}$) de creatina cinasa (CK) en plasma o sèrum mesurada mitjançant la velocitat de conversió del fosfat de creatina a 37 °C en el procediment de mesura de referència primari de la IFCC.

El principi de la reacció catalitzada per la CK es basa en la transformació dels substrats fosfat de creatina i adenosina difosfat (ADP) en els productes creatina i adenosina trifosfat (ATP) a pH 6,50. Per poder mesurar la velocitat de conversió dels substrats es necessari acoblar dues reaccions, una auxiliar i l'altra indicadora. L'auxiliar, catalitzada per l'enzim hexocinasa (HK), transforma l'ATP i la glucosa en ADP i glucosa-6-fosfat. Finalment, la indicadora, catalitzada per l'enzim glucosa-6-fosfat deshidrogenasa (G6PD), utilitza el substrat glucosa-6-fosfat juntament amb NADP per generar gluconat-6-fosfat i NADPH. El NADPH és el producte indicador de la reacció que absorbeix llum a una longitud d'ona de 339 nm (Figura 27). L'enzim CK s'inactiva ràpidament en sèrum, per tant per la seva mesura es necessari un activador, l'N-acetil-L-cisteïna (NAC), i la presència d'ions magnesi per a que es pugui donar la reacció.

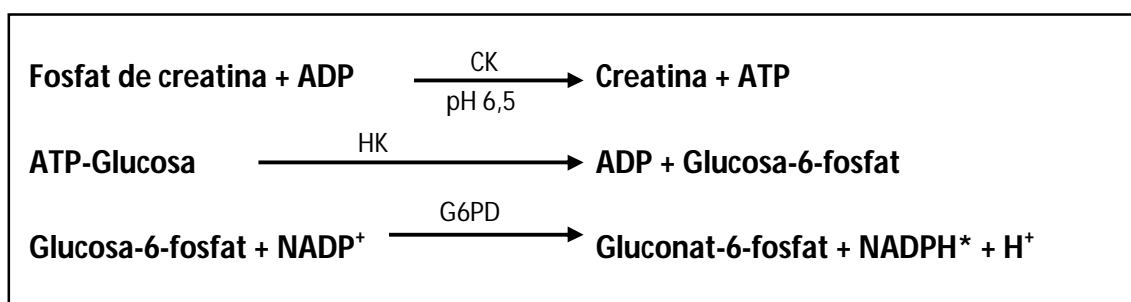


Figura 27. Reaccions acoblades per a la mesura de l'activitat catalítica de la CK. (*) Producte indicador.

4.2.2. Identificació de les fonts d'incertesa

A la Figura 28 es mostren les possibles fonts d'incertesa de la mesura de la concentració catalítica de la CK. Com es pot observar, pràcticament totes les fonts són les mateixes que les del procediment de la GGT, ja que els procediments de mesura de referència per la mesura de la concentració catalítica dels enzims es basen en el mateix principi: l'espectrometria d'absorció molecular.

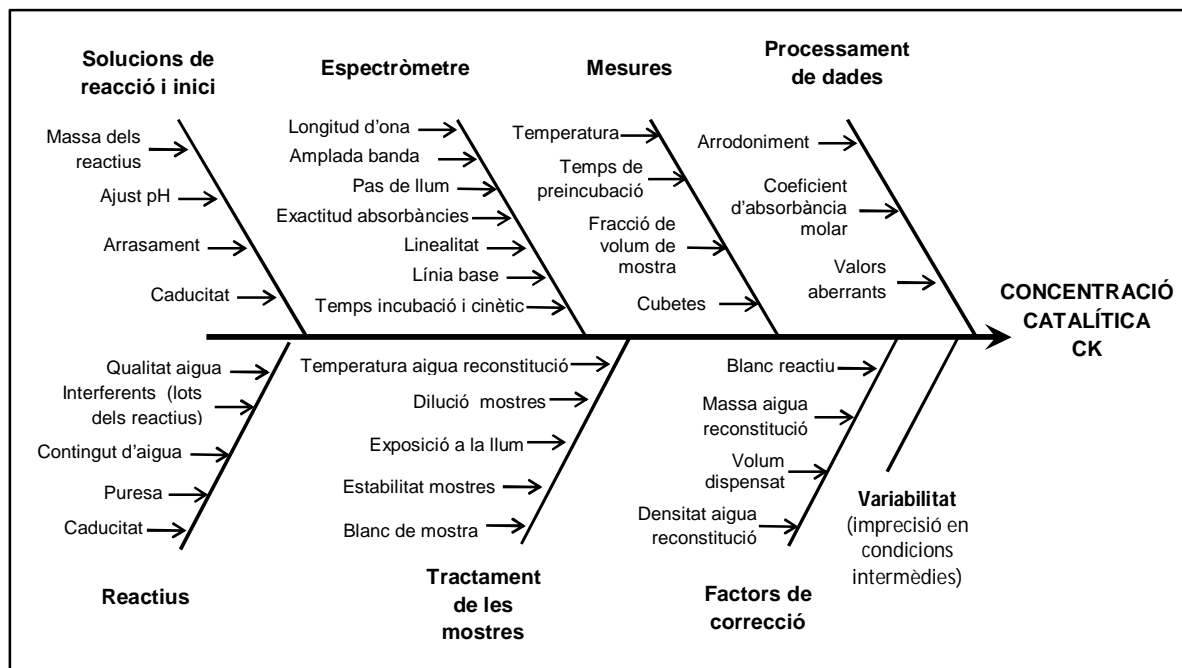


Figura 28. Diagrama de causa i efecte de les possibles fonts d'incertesa del procediment per a la mesura de la concentració catalítica de l'enzim CK.

4.2.3. Estudi de les fonts d'incertesa: estimació de la incertesa estàndard i càlcul dels coeficients de sensibilitat

L'existència de les mateixes fonts d'incertesa per els dos procediments de mesura pot generar que en aquest apartat apareguin explicacions repetides de l'estudi d'algunes fonts que ja s'han mencionat a l'apartat 4.1. Per tal d'evitar-ho i fer més agradable la lectura, només es mostraran aquelles fonts d'incertesa que tinguin una contribució diferent a la incertesa de mesura de la CK.

4.2.3.1. Reactius

4.2.3.1.1. Interferents i lots de reactiu

El principal interferent que afecta a la mesura de l'activitat catalítica de la CK és l'adenilat cinasa (AK). Aquest enzim s'acobla a la reacció de la CK transformant 2 molècules d'ADP en una molècula d'ATP, substrat de la reacció auxiliar per la mesura de la CK, i en una molècula d'AMP. L'AK es troba tant en els reactius dels enzims auxiliars, glucosa-6-fosfat deshidrogenasa i hexocinasa, com a les mostres, ja que es sintetitza als mateixos teixits que la CK.

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

La concentració d'impureses dels enzims auxiliars ha de ser el més petita possible i la concentració d'AK als reactius dels enzims auxiliars ha de ser < 0,01 %.

- *Incertesa estàndard:*

Es va realitzar un estudi de tots els reactius que s'utilitzen en el procediment de mesura de la CK i només es va trobar l'AK com a interferent. Els reactius dels enzims auxiliars complien amb el requisit. Així doncs, es va suposar que l'efecte generat per l'AK a concentracions tant petites seria inapreciable, ja que la reacció de mesura de la CK contenia inhibidors (AMP i P^1, P^5 -diadenosina-5'-pentafofat) de l'activitat AK. Per tant, es va descartar la contribució de l'interferent a la incertesa de mesura.

Per altra banda, es va decidir estudiar l'efecte entre lots dels reactius que tenien una concentració a la barreja final de reacció més elevada: l'imidazol (100 mmol/L) i el fosfat de creatina (30 mmol/L). El primer es troba a la solució de reacció i el segon a la solució d'inici. Es van preparar dues solucions de reacció amb diferents lots (a i b) d'imidazol i dues solucions d'inici amb diferents lots (a i b) de fosfat de creatina. Es van realitzar deu mesures per cada condició:

1. SR-a + SI-b
2. SR-a + SI-a
3. SR-b + SI-a

La condició SR-b + SI-b no es va provar per manca de reactiu fosfat de creatina del lot b. Les mitjanes dels 10 valors de concentració catalítica van ser per la condició 1 = 5,26 $\mu\text{kat/L}$, per la condició 2 = 5,31 $\mu\text{kat/L}$ i per la condició 3 = 5,22 $\mu\text{kat/L}$. Únicament les variacions dels valors de concentració catalítica de les condicions 2 i 3, produïdes per les diferències entre lots d'imidazol, van ser significatives, amb una $p = 0,002$ per una anàlisi ANOVA amb contrast *Scheffé* ($\alpha = 0,05$). Un dels lots d'imidazol feia pocs dies que havia perdut alguna de les propietats inicials indicades pel fabricant, sent una possible causa d'aquestes diferències.

Tot i l'observació de variacions dels valors del mesurand, es va descartar la contribució d'aquesta font a la incertesa de mesura per falta de dades. Seria convenient poder realitzar un experiment molt més extensiu on el número de lots diferents dels reactius fos elevat.

4.2.3.1.2. *Contingut d'aigua dels reactius*

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

El contingut d'aigua dels reactius que s'han d'utilitzar en la mesura de concentració catalítica de CK és:

Imidazol, anhidre ($\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2$).

Fosfat de creatina, sal disòdica, tetrahidrat ($\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_5\text{PNa} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$).

Acetat de magnesi, tetrahidrat ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{Mg} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$).

D-glucosa, deshidratada ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$).

EDTA, sal disòdica, dihidrat ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_8\text{N}_2\text{Na} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$).

AMP, sal disòdica, hexahidrat ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_7\text{PNa}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$).

ADP, sal monopotàssica, dihidrat ($\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2\text{K} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$).

N-acetil-L-cisteïna, anhidre ($\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_3\text{S}$).

NADP, sal disòdica, anhidre ($\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_7\text{O}_{17}\text{P}_3\text{Na}_2$).

P^1 , P^5 -diadenosina-5'-pentafosfat, sal pentalítica, anhidre ($\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_{10}\text{O}_{22}\text{P}_5\text{Li}_5$).

Clorur de sodi, anhidre (NaCl).

- *Incertesa estàndard:*

L'ús dels reactius amb les característiques desitjades descartava el contingut d'aigua com a font d'incertesa. En aquest estudi, únicament el reactiu AMP amb número de referència 10000094 (Roche), no va complir amb el requisit del procediment de mesura de referència. El reactiu AMP havia de ser hexahidrat i amb una massa molar de 499,2 g/mol, però el reactiu utilitzat va ser anhidre i amb massa molar de 391,2 g/mol. Per aquest reactiu només es disposava d'un únic proveïdor. En aquests casos s'hauria de provar l'existència de canvis significatius en la concentració catalítica del mesurand. Però, la falta de reactius amb diferents continguts d'aigua (mantenint les altres característiques iguals) va fer impossible poder realitzar un experiment per determinar la incertesa. És important destacar que la quantitat de massa del reactiu utilitzada per preparar les solucions es va corregir per la seva massa molar. Així, es van mantenir les condicions del procediment de mesura de referència el més similars possible.

4.2.3.1.3. Caducitat dels reactius

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

Els reactius han de mantenir les seves característiques inicials, indicades pels proveïdors, per poder ser utilitzats, per tant s'han d'utilitzar abans de la seva data de caducitat.

- *Incertesa estàndard:*

Els reactius s'han de mantenir en unes condicions d'emmagatzematge idònies, perquè les característiques inicials siguin les desitjades per al seu ús. Els reactius que tenien una data de caducitat indicada pel fabricant, que van ser conservats a la temperatura especificada als seus certificats, i que es van utilitzar sempre dintre de les seves dates de caducitat, van ser considerats com a reactius que mantenien les seves característiques inicials. Aleshores, la caducitat va quedar descartada com a font d'incertesa.

En aquest estudi, els reactius acetat de magnesi (Merck), D-glucosa (Merck), glicerol (USB) i P¹,P⁵-diadenosina-5'-pentafosfat (Sigma) no tenien data de caducitat informada pel fabricant. Per tant és en aquests casos on la incertesa deguda a l'estabilitat dels reactius pot ser important. A aquests reactius se'ls hi va donar una data de caducitat de tres anys a partir de la data de compra i es van conservar a la temperatura especificada pel fabricant. Les temperatures d'emmagatzematge es van controlar diàriament per mantenir la qualitat dels

reactius. Quan es feien servir es comprovava que els reactius tinguessin bon aspecte, que mantinguessin el color original, que no fessin grumolls, etc. Tot i aquestes precaucions podria donar-se el cas que els reactius perdessin les seves característiques originals, generant d'aquesta manera variacions en la concentració catalítica. Per altra banda, el blanc de reactiu es mesurava per controlar el bon estat de les solucions, i per tant dels reactius. Com no es va superar el requisit del blanc de reactiu (absorbància / temps < $2,5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) es va considerar que els reactius tenien una bona qualitat.

4.2.3.2. Solucions de reacció i d' inici

4.2.3.2.1. Massa dels reactius

- *Requisits:*

Es va establir una incertesa $\leq 1 \%$ ($k = 2$, interval de confiança del 95 %) per el valor de la massa del reactiu en cada pesada.

- *Incertesa estàndard:*

La solució de reacció està constituïda per 20 mL de solució 1 (imidazol 116,2 mmol/L, acetat de magnesi 14,52 mmol/L, NADP 2,904 mmol/L, glucosa 29,04 mmol/L, ADP 2,904 mmol/L, AMP 7,259 mmol/L i P^1, P^5 -diadenosina-5'-pentafosfat 0,01452 mmol/L), 0,25 mL de solució 2 (HK 15,49 mkat/L i G6PD 10,84 mkat/L) i 5 mL de solució 3 (imidazol 116,2 mmol/L, EDTA 11,62 mmol/L i NAC 116,2 mmol/L). La solució d'inici està formada per fosfat de creatina 345 mmol/L. Es va estimar la incertesa estàndard de la massa dels reactius separadament per la solució de reacció i la solució d'inici, a partir de la informació del certificat de calibratge número 10/34515303 (octubre 2010) de la balança analítica. Es van tenir en compte les quantitats de massa de reactiu especificades al procediment de mesura per cadascuna de les solucions (Annex 2). A la Taula 31 es mostra la massa dels reactius que formen part de la solució de reacció juntament amb les seves incerteses associades. La incertesa estàndard de la solució de reacció es va calcular a partir de la combinació de les incerteses estàndards ($u_s = U / 2$) de cada reactiu. La solució 2 no es va tenir en compte degut a que la concentració dels seus components es trobava en excés i petites variacions en la massa no afectaven als valors de concentració catalítica del mesurand. Per altra banda, la solució d'inici conté 1,13 g de fosfat de creatina, amb una incertesa expandida associada de

$1,3 \times 10^{-4}$ g ($k = 2$). Així doncs, la incertesa estàndard de la massa de la solució d'inici va ser 0,0058 %.

Taula 31. Valors de massa i d'incertesa associada de cada reactiu de la solució de reacció. (U) simbolitza la incertesa expandida i (u_s) la incertesa estàndard.

SR	Reactius	Massa (g)	U (g) (k=2)	U (%)	u_s (%)
Solució 1	Imidazol	0,791	$1,3 \cdot 10^{-4}$	0,0164	0,0082
	Acetat de Mg	0,313	$1,2 \cdot 10^{-4}$	0,0383	0,0192
	NADP	0,229	$1,2 \cdot 10^{-4}$	0,0524	0,0262
	Glucosa	0,523	$1,2 \cdot 10^{-4}$	0,0229	0,0115
	ADP	0,146	$1,2 \cdot 10^{-4}$	0,0822	0,0411
	AMP	0,284	$1,2 \cdot 10^{-4}$	0,0423	0,0211
Solució 3	Imidazol	0,395	$1,2 \cdot 10^{-4}$	0,0304	0,0152
	EDTA	0,216	$1,2 \cdot 10^{-4}$	0,0556	0,0278
	NAC	0,958	$1,3 \cdot 10^{-4}$	0,0136	0,0068
u_s (%) de la massa de la solució de reacció					0,0666

- *Coefficient de sensibilitat:*

De tots els reactius anteriors es va comprovar com afectava la variació de la quantitat de massa de l'imidazol, el NAC, i l'AMP. Es van descartar els reactius amb una concentració a la barreja final de reacció: glucosa (20 mmol/L), NADP (2 mmol/L), ADP (2 mmol/L) i fosat de creatina (30 mmol/L), ja que es coneixia per estudis previs (60, 61) que variacions de la concentració ≤ 10 % no afectaven al valor de la concentració catalítica del mesurand.

Imidazol: es van preparar quatre solucions de reacció diferents, variant la concentració d'imidazol (a la barreja final de reacció) en intervals del 10 %. Es va mesurar per quadruplicat la concentració catalítica de la CK del SCH II amb cadascuna de les solucions. A la Taula 32 es mostren els resultats obtinguts. Es va obtenir un coeficient de sensibilitat = 0,07 % per cada % de la concentració d'imidazol ($R^2 = 0,98$). Les diferències entre els valors de les mitjanes no van ser significatives, amb una $p = 0,11$ per una anàlisi ANOVA ($\alpha = 0,05$).

Taula 32. Valors de la concentració catalítica de la CK segons la concentració d'imidazol.

Imidazol (mmol/L)	Concentració catalítica (μkat/L)				Mitjana	%
90	4,780	4,770	4,745	4,790	4,765	101,0
100	4,718	4,743	4,742	4,669	4,718	100,0
110	4,706	4,697	4,688	4,699	4,698	99,6
120	4,653	4,660	4,661	4,657	4,658	98,7

NAC: es van preparar quatre solucions de reacció diferents amb concentracions (a la barreja final de reacció) de NAC de 16, 18, 20 i 22 mmol/L. Es van fer mesures per quadruplicat de la concentració catalítica de la CK del SCH II amb cadascuna d'elles (Taula 33). Les variacions dels valors de concentració catalítica obtinguts no van ser significatius, amb una $p = 0,41$ per una anàlisi ANOVA ($\alpha = 0,05$).

Taula 33. Valors de la concentració catalítica de la CK segons la concentració d'N-acetil-L-cisteïna.

NAC (mmol/L)	Concentració catalítica (μkat/L)				Mitjana	%
16	4,600	4,638	4,638	4,635	4,625	99,7
18	4,615	4,604	4,610	4,644	4,618	99,5
20	4,664	4,652	4,634	4,616	4,641	100,0
22	4,628	4,652	4,602	4,593	4,619	99,5

AMP: es van preparar quatre solucions de reacció diferents amb concentracions (a la barreja final de reacció) d'AMP de 4, 5, 6 i 7 mmol/L. Es va mantenir la relació AMP/ADP de 2,5 ja que si no variaven les condicions de la inhibició de l'AK. Es van realitzar mesures per quadruplicat de la concentració catalítica de la CK del SCH II amb cadascuna d'elles (Taula 34). Les variacions observades entre els valors de concentració catalítica no van ser significatives, amb una $p = 0,77$ per una anàlisi ANOVA ($\alpha = 0,05$).

Taula 34. Valors de la concentració catalítica de la CK segons la concentració d'AMP.

AMP (mmol/L)	Concentració catalítica ($\mu\text{kat/L}$)				Mitjana	%
4	4,889	4,875	4,882	4,863	4,882	99,9
5	4,919	4,870	4,878	4,871	4,885	100,0
6	4,969	4,853	4,898	4,876	4,899	100,3
7	4,844	4,882	4,897	4,900	4,881	99,9

Finalment, a partir de la informació i dels resultats anteriors es va assumir que els valors dels coeficients de sensibilitat per cadascun dels reactius eren molt propers a 0.

4.2.3.2.2. Ajust de pH

- *Requisit del procediment de mesura de referència:*

La incertesa expandida del valor del pH ha de ser $\leq 0,05$ ($k = 2$).

- *Incertesa de mesura:*

La reacció catalitzada per la CK es produeix a pH 6,50 (37 °C). Es va ajustar el pH de les solucions 1 i 3, per obtenir la solució de reacció amb el valor de pH desitjat, ja que la barreja final de reacció està constituïda en major part per aquesta solució.

El pHmetre es va calibrar diàriament fent servir 3 solucions tampó certificades de pH ($4 \pm 0,02$), ($7 \pm 0,02$) i ($11 \pm 0,02$) ($k = 2$). La desviació de $\pm 0,1$ °C de la sonda de temperatura de l'elèctrode de pH produïa variacions de pH inferiors a la incertesa dels tampons (variacions $< 0,004$ pH per $0,1$ °C). Així doncs, es va descartar la seva contribució a la incertesa del pH.

Per tant, la incertesa estàndard del valor de pH de la solució de reacció (pH = 6,5 (37°C)) es va estimar combinant les incerteses estàndards de les tres solucions tampó certificades:

$$u_s = \sqrt{3 \times (0,01)^2} = 0,0173 \text{ pH.}$$

- *Coefficient de sensibilitat*

Es van preparar cinc solucions de reacció amb valors diferents de pH: 6,358, 6,411, 6,462, 6,515 i 6,565, ajustant la solució 1 i la solució 3 al corresponent pH. Una vegada barrejades les dues solucions, es va recomprovar el pH de cadascuna a 37 °C. Després, es van realitzar mesures per quadruplicat de la concentració catalítica de la CK en el SCH II amb cada solució

de reacció preparada. A la Taula 35 es mostren els resultats obtinguts de l'efecte del pH en l'activitat de la CK.

Taula 35. Valors de la concentració catalítica de la CK segons el pH de la solució de reacció.

pH	Concentració catalítica ($\mu\text{kat/L}$)				Mitjana
6,358	5,094	5,111	5,096	5,062	5,100
6,411	5,049	5,064	5,022	5,041	5,044
6,462	4,948	4,960	4,970	4,961	4,960
6,515	4,924	4,887	4,879	4,945	4,909
6,565	4,783	4,844	4,836	4,798	4,815

Els resultats es representen a la Figura 29, on s'observa un augment de la concentració catalítica en disminuir el pH. La concentració catalítica variava en un 28,0 % per cada unitat de pH. L'experiment es va repetir 3 vegades degut a la dificultat en l'ajust de pH de la solució de reacció. Es va obtenir un coeficient de sensibilitat del 27,2 % per unitat de pH a partir de la mitjana dels coeficients calculats en cadascun dels experiments, ja que els resultats obtinguts eren pràcticament iguals.

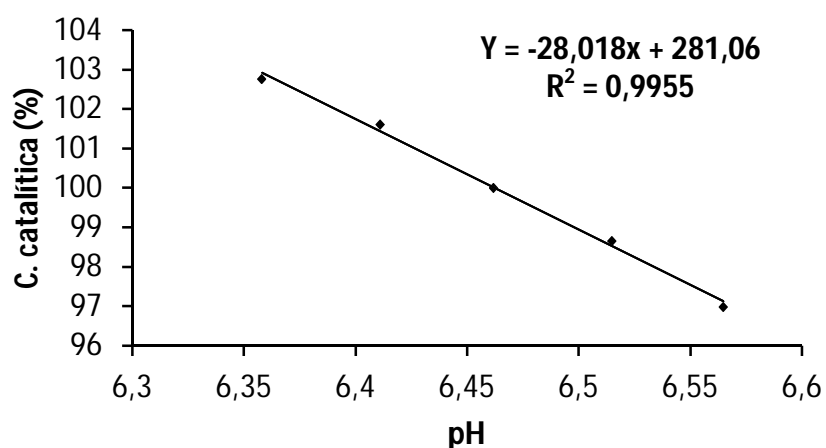


Figura 29. Variació de la concentració catalítica (%) de la CK segons el pH.

4.2.3.2.3. Arrasament de les solucions

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

S'han d'utilitzar matraus de vidre de classe A per mesurar el volum de les solucions que formen part de la solució de reacció i la solució d'inici. L'arrasament es va realitzar a una temperatura de $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$ en un bany d'aigua amb termostatació, controlant la temperatura de la solució de l'interior del matrau amb un termòmetre de vidre.

- *Incertesa estàndard:*

La incertesa estàndard del volum de les solucions produïda per l'arrasament dels matraus es va estimar utilitzant el mateix procediment que a l'apartat 4.1.3.2.3. Es van calcular les incerteses estàndard dels volums de la solució de reacció (formada per les solucions 1, 2 i 3) i de la solució d'inici. Els valors dels volums utilitzats van ser 100 mL per la solució 1, 0,5 mL per la solució 2, 50 mL per la solució 3 i 10 mL per la solució d'inici.

La incertesa del calibratge del matrau es va obtenir del certificat del matrau. Es va suposar que els valors de volum adoptaven una distribució rectangular.

La incertesa de la repetibilitat de l'arrasament es va calcular a partir de l'error estàndard de la mitjana de 10 valors de massa. Es van realitzar deu arrasaments diferents amb aigua destil·lada, per cada matrau, pesant cada vegada la seva massa.

La incertesa de la expansió del volum d'aigua segons la temperatura es va calcular tenint en compte les variacions de temperatura de $\pm 1 ^\circ\text{C}$, la distribució rectangular adoptada pels valors de temperatura i el coeficient d'expansió $(2,1 \times 10^{-4}) ^\circ\text{C}^{-1}$, generat per la variació de la densitat de l'aigua segons la temperatura.

Per la solució de reacció:

- Solució 1:

Calibratge del matrau: $(100 \pm 0,04) \text{ mL}$, $u_s = 0,04/\sqrt{6} = 0,0163 \text{ mL}$.

Repetibilitat: $u_s = ds/\sqrt{n} = 0,016/\sqrt{10} = 0,0052 \text{ mL}$.

Expansió del volum: $u_s = (100 \times \pm 1 \times 2,1 \times 10^{-4})/\sqrt{3} = 0,0121 \text{ mL}$.

La $u_{s1} = \sqrt{(0,0163)^2 + (0,0052)^2 + (0,0121)^2} = 0,021 \text{ mL}$.

- Solució 2: un volum dispensat amb pipeta automàtica P-1000 (0,5 mL), segons la verificació del dia 14.07.11 (els valors no varien respecte a altres verificacions realitzades), la incertesa estàndard associada era de 0,0015 mL.
- Solució 3:

Calibratge del matrau: $(50 \pm 0,02)$ mL, $u_s = 0,02 / \sqrt{6} = 0,0082$ mL

Repetibilitat: $u_s = 0,0084 / \sqrt{10} = 0,0027$ mL.

Expansió del volum: $u_s = (50 \times \pm 1 \times 2,1 \times 10^{-4}) / \sqrt{3} = 0,0061$ mL.

La $u_{s3} = \sqrt{(0,0082)^2 + (0,0027)^2 + (0,0061)^2} = 0,011$ mL.

La incertesa estàndard combinada del volum de la solució de reacció (50,5 mL) va ser:

$$u_{SR} = \sqrt{(0,021)^2 + (0,002)^2 + (0,011)^2} = 0,024 \text{ mL.}$$

Per la solució d'inici:

Calibratge del matrau: $(10 \pm 0,01)$ mL, $u_s = 0,01 / \sqrt{6} = 0,0041$ mL.

Repetibilitat: $u_s = 0,0033 / \sqrt{10} = 0,0011$ mL.

Expansió del volum: $u_s = (10 \times \pm 1 \times 2,1 \times 10^{-4}) / \sqrt{3} = 0,0012$ mL.

La $u_{SI} = \sqrt{(0,004)^2 + (0,001)^2 + (0,001)^2} = 0,004$ mL.

- *Coefficient de sensibilitat:*

A l'apartat 4.2.3.2.1 es mostra com variacions en la concentració del reactiu < 10 % no comportaven canvis significatius en els valors de concentració catalítica del mesurand. Les incerteses dels volums de les solucions incrementen la variació de la concentració dels reactius en més d'un 10 %. Per tant, es va considerar que el coeficient de sensibilitat prenia un valor molt proper a 0.

4.2.3.2.4. *Caducitat de les solucions*

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

No es poden utilitzar les solucions 1, 2, 3 i d'inici després de 14 dies (4 °C), 3 mesos (-20 °C), 7 dies (4 °C) i 1 mes (4 °C), respectivament, de la seva preparació.

- *Incertesa estàndard:*

La contribució a la incertesa de mesura d'aquesta font s'ha descartat, degut a que no es van utilitzar les solucions fora de les seves dates de caducitat.

4.2.3.3. *Espectròmetre*

4.2.3.3.1. *Longitud d'ona*

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

S'accepta una desviació del valor de la longitud d'ona de (339 ± 1) nm.

- *Incertesa estàndard:*

El certificat del patró d'òxid d'holmi, lot HC083070, especificava una exactitud per la longitud d'ona, 339 nm, de $(333,5 \pm 0,3)$ nm. Es va observar que l'espectròmetre durant els quatre anys d'estudi (2008-2012) mostrava unes desviacions entre -0,3 nm i 0,1 nm a 333,5 nm. Donat que aquesta desviació es trobava dins de l'interval de la incertesa del patró, la incertesa estàndard de la longitud d'ona es va calcular de la mateixa manera que en el procediment de mesura de la GGT:

$$u_s = \frac{0,3}{\sqrt{3}} = 0,173 \text{ nm}$$

- *Coefficient de sensibilitat:*

Es va mesurar la concentració catalítica de la CK en el material SCH II a cinc longituds d'ona diferents: 337, 338, 339, 340 i 341 nm. Es van realitzar 3 sèries de mesures en diferents dies, pel primer dia es van realitzar quadruplicats i pels dies següents triplicats per cadascuna de les longituds d'ona.

No es va obtenir una relació lineal entre els valors de concentració catalítica i les longituds d'ona, però sí que es van observar diferències significatives entre els valors de concentració catalítica amb una $p = 0,03$ per una anàlisi ANOVA ($\alpha = 0,05$).

Així doncs, el coeficient de sensibilitat de la longitud d'ona es va estimar com la variabilitat dels valors de concentració catalítica per l'increment de longitud d'ona. Primer, es va calcular la variància entre els valors de les mitjanes de concentració catalítica dels replicats mesurats per cada nm i per cada dia. Després, es va dividir la variància per l'increment de longitud d'ona. A la Taula 36 s'observen els valors de les mitjanes de concentració catalítica obtinguts i el valor del coeficient de sensibilitat calculat per cada dia en unitats de variància per l'increment de longitud d'ona ($\text{Var}/\Delta\lambda$).

Taula 36. Valors de la mitjana de la concentració catalítica de la CK ($\mu\text{kat/L}$) segons la longitud d'ona. ($\text{Var}/\Delta\lambda$) representa la variància dividida per l'increment de longitud d'ona.

Dia \ λ (nm)	337	338	339	340	341	Var/$\Delta\lambda$
18.02.11	-	5,030	4,963	4,982	4,959	$2,63 \times 10^{-4}$
05.04.11	4,928	4,928	4,936	4,978	4,976	$1,30 \times 10^{-4}$
09.06.11	4,730	4,660	4,688	4,677	4,779	$4,56 \times 10^{-4}$

Posteriorment, es va fer una mitjana dels tres valors de $\text{Var}/\Delta\lambda$ i es va passar a unitats de desviació estàndard, obtenint-se un valor de $0,017 \mu\text{kat/L}$ de variació per nm. Finalment, es va obtenir un coeficient de sensibilitat de $0,350 \%$ per nm (tenint en compte la mitjana dels valors de concentració catalítica llegida a 339 nm , és a dir $4,862 \mu\text{kat/L}$).

4.2.3.3.2. Exactitud de les absorbàncies

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

La incertesa expandida del resultat de la mesura fotomètrica no ha de superar l'1 % ($k = 2$ per una distribució normal).

- *Incertesa estàndard:*

L'exactitud de les absorbàncies es verifica a 339 nm mitjançant quatre filtres neutres patró, d'absorbàncies distribuïdes entre $0,17$ i $1,95$. Cadascuna de les absorbàncies porta associada una incertesa, la qual s'especifica al certificat de calibratge número 93402 (09.05.07) dels filtres (Taula 37).

Taula 37. Incertesa expandida i estàndard associada als valors de les absorbàncies dels filtres neutres patró.

Filtres	Absorbàncies	Incertesa expandida (k =2)	Incertesa estàndard (u_{sf})
1	0,1766	0,0027	0,00135
2	0,4807	0,0027	0,00135
3	1,3803	0,0052	0,00260
4	1,9404	0,0059	0,00295

La incertesa estàndard de l'exactitud de les absorbàncies es va estimar com s'explica a l'apartat 4.1.3.3.2. A la Taula 38 es mostren els valors d'absorbància obtinguts per cada filtre en cinc verificacions diferents, i les incerteses estàndard per cada valor d'absorbància degudes a la imprecisió de l'espectròmetre, expressades com (ds/vn).

Taula 38. Valors d'absorbància obtinguts per cada filtre.

Filtres	Absorbància mesurada					Mitjana	ds/vn
	15.09.08	26.04.10	03.01.11	18.10.11	23.04.12		
1	0,1800	0,1765	0,1780	0,1775	0,1781	0,178	0,000579
2	0,4880	0,4850	0,4870	0,4870	0,4855	0,486	0,001360
3	1,3945	1,3930	1,3935	1,3985	1,3952	1,395	0,000901
4	1,9295	1,9265	1,9290	1,9225	1,9258	1,926	0,001222

Posteriorment, es va combinar la incertesa estàndard dels filtres (u_{sf}) amb la incertesa de la imprecisió de les absorbàncies per cadascun dels filtres de la forma següent:

$$u_{sf}^2 + \frac{ds^2}{n} = u_{saf}^2$$

A la Taula 39 es mostren els càlculs realitzats per obtenir la incertesa estàndard de l'exactitud de les absorbàncies (u_s). Es va realitzar una mitjana dels quatre valors d'incertesa estàndard de l'exactitud de l'absorbància de cada filtre (u_{saf}^2) per obtenir l' u_s .

Taula 39. Valor de la incertesa estàndard de l'exactitud de les absorbàncies (u_s).

Filtres	ds/vn	u_{sf}	u_{saf}^2	u_{saf}^2 (%)	
1	0,00058	0,0014	$2,16 \times 10^{-6}$	0,6918	
2	0,00136	0,0014	$3,67 \times 10^{-6}$	0,1589	
3	0,00090	0,0026	$7,57 \times 10^{-6}$	0,0397	
4	0,00122	0,0030	$1,02 \times 10^{-5}$	0,0271	
				0,2294	u_s^2
				0,4789	u_s

- *Coefficient de sensibilitat:*

El coeficient de sensibilitat prenia un valor igual a 1, ja que les variacions que es produïen en l'absorbància es tradueixen en canvis en la concentració catalítica en la mateixa proporció que els anteriors.

4.2.3.3.3. Linealitat

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

El pendent de la cinètica enzimàtica ha de ser lineal per poder calcular l'activitat catalítica.

- *Incertesa estàndard:*

Anualment es realitza una verificació de la linealitat dels valors d'absorbància de l'espectròmetre a 339 nm. Es van preparar cinc solucions amb diferents concentracions d'ABTS: 5, 10, 15, 20 i 25 mg/L i es va mesurar l'absorbància de cadascuna d'elles. A partir d'aquestes dades es van calcular cinc valors de la pendent de la recta en %.

La incertesa estàndard de la linealitat (u_s) es va estimar de la mateixa manera que a l'apartat 4.1.3.3.3, a partir del càlcul de l'error estàndard de la mitjana de les pendents mitjanes, obtingudes en cada verificació realitzada des de 2008 a 2011. A la Taula 40 es mostren els pendents calculats per cada verificació i la incertesa estàndard de la linealitat.

Taula 40. Valors dels pendents (%) per cada verificació. Incertesa estàndard de la linealitat (u_s).

Interval de concentració ABTS (mg/L)	Dia					u_s (%)
	30.09.08	29.09.09	26.04.10	03.01.11	19.10.11	
0 – 5	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	
5 – 10	99,0	100,0	99,8	100,1	100,8	
10 – 15	100,6	99,9	100,5	99,6	99,5	
15 – 20	99,7	99,9	100,4	99,4	99,9	
20 – 25	100,1	99,5	99,0	99,5	100,2	
Mitjana (%)	99,9	99,9	99,4	99,7	100,1	0,0584

- *Coeficient de sensibilitat:*

El coeficient de sensibilitat per la linealitat prenia un valor igual a 1, ja que les variacions en el pendent de la cinètica enzimàtica es tradueixen a canvis d'igual proporció en els valors del mesurand.

4.2.3.3.4. *Altres factors d'incertesa*

- *Temps programats d'incubació i de cinètica:* els temps programats a l'equip (incubació: 120 s i cinètica: 120 s) eren controlats per l'espectròmetre. El cronòmetre intern de l'equip no es va poder calibrar o verificar per la manca de disponibilitat d'un rellotge patró. Per tant, no es va poder estimar una incertesa associada a aquest valor. Però, la variació dels valors del mesurand, produïda per aquest factor, es va recollir en el càlcul de la variabilitat en condicions intermèdies del valors del mesurand.
- *Línia base:* és important que la línia base es mantingui al llarg del temps per evitar oscil·lacions d'absorbàncies. Es va mesurar l'absorbància de l'aigua destil·lada a 339 nm cada minut durant 30 minuts, observant una variació de 0,001 unitats d'absorbància als 30 minuts. D'aquets manera es va confirmar l'estabilitat de la línia base. Les possibles variacions dels valors del mesurand que pugui generar l'oscil·lació d'absorbància es recullen en el càlcul de la variabilitat en condicions intermèdies del valors del mesurand.

4.2.3.4. Mesures

4.2.3.4.1. Temperatura

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

La temperatura de la reacció ha de ser de $(37 \pm 0,1) \text{ }^\circ\text{C}$ ($k = 2$).

- *Incertesa estàndard:*

El termòmetre de sonda per controlar la temperatura de la reacció a la cubeta té una incertesa expandida a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ de $0,06 \text{ }^\circ\text{C}$, amb un factor de cobertura $k = 2$ per una distribució normal, segons el certificat de calibratge número 11/34508459 (juny 2011). Per tant la incertesa estàndard es va calcular: $u_s = 0,06 / 2 = 0,03 \text{ }^\circ\text{C}$.

- *Coefficient de sensibilitat:*

Es va mesurar per triplicat la concentració catalítica de la CK del SCH II a les següents temperatures: $36,0$, $36,5$, $37,0$, $37,5$ i $38,0 \text{ }^\circ\text{C}$. A la Taula 41 es mostren els resultats obtinguts.

Taula 41. Valors de la concentració catalítica de la CK segons la temperatura.

T ($^\circ\text{C}$)	Concentració catalítica ($\mu\text{kat/L}$)			Mitjana
36,0	4,401	4,400	4,500	4,434
36,5	4,533	4,499	4,479	4,504
37,0	4,612	4,611	4,597	4,607
37,5	4,704	4,719	4,670	4,697
38,0	4,778	4,778	4,781	4,779

A la Figura 30 es representen els valors de les mitjanes de la concentració catalítica en % en front la temperatura. El coeficient de sensibilitat prenia un valor de $3,84 \%$ de variació en la concentració catalítica per $^\circ\text{C}$ de temperatura.

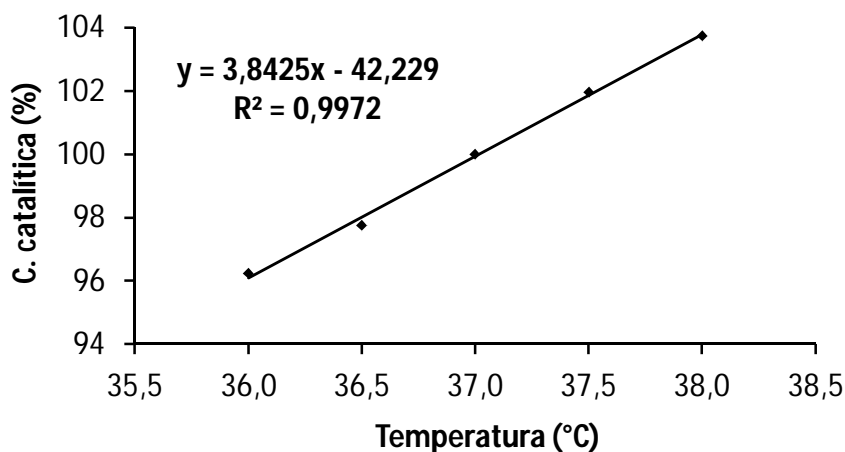


Figura 30. Variació de la concentració catalítica (%) de la CK segons la temperatura.

4.2.3.4.2. Fracció de volum de mostra

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

La incertesa expandida de la fracció de volum de mostra ha de ser $\leq 1\%$ per un factor de cobertura $k = 2$ (tenint en compte una distribució normal).

- *Incertesa estàndard:*

Segons el procediment de mesura, el volum de la solució de reacció és 2,00 mL, el volum de mostra és 0,10 mL i el volum de la solució d'inici és 0,20 mL ($V_t = 2,30$ mL). Això dona una $FV_m = 0,0435$. Aquests volums van ser dispensats amb pipetes automàtiques que es verifiquen cada tres mesos, obtenint-se així una incertesa associada a cada volum. La incertesa estàndard de la FV_m es va estimar, de la mateixa manera que s'ha explicat a l'apartat 4.1.3.4.2., a partir dels volums dispensats i de les seves incerteses associades.

Es van fer servir les dades de la verificació dels dies 07.04.11 i 14.07.11, les quals no diferien de la resta de dades de les verificacions realitzades. A la Taula 42 es mostren els valors de les incerteses expandides (U) i estàndard (u_s) obtingudes de les verificacions.

Taula 42. Valors de la incertesa expandida (U) i estàndard (u_s) dels volums dispensats per les pipetes automàtiques.

	Dia verificació	07.04.11		14.07.11	
Solució	Volum (mL)	$U(\%) (k = 2)$	$u_s(\%)$	$U(\%) (k = 2)$	$u_s(\%)$
Mostra	0,10	0,797	0,399	0,702	0,351
Inici	0,20	0,543	0,272	0,534	0,267
Reacció	2 x 1,00	0,508	0,254	0,607	0,304

Primer es va calcular la incertesa estàndard (u_s) del volum total:

$$\text{Dia 07.04.11 } u_s(Vt) = \sqrt{0,399^2 + 0,272^2 + (2 \times 0,254)^2} = 0,601 \% \text{ i}$$

$$\text{Dia 14.07.11 } u_s(Vt) = \sqrt{0,351^2 + 0,267^2 + (2 \times 0,304)^2} = 0,615 \%$$

Posteriorment, es va calcular la incertesa estàndard (u_s) de la FVm :

$$\text{Dia 07.04.11 } u_s(FVm) = 0,0435 * \sqrt{\left(\frac{0,399}{0,10}\right)^2 + \left(\frac{0,601}{2,30}\right)^2} = 0,1736 \%$$

$$\text{Dia 14.07.11 } u_s(FVm) = 0,0435 * \sqrt{\left(\frac{0,351}{0,10}\right)^2 + \left(\frac{0,615}{2,30}\right)^2} = 0,1531 \%$$

Finalment, el valor de la incertesa estàndard de la FVm es va estimar a partir de la mitjana de les dues $u_s(FVm)$:

$$u_s(FVm) = \sqrt{\left(\frac{(0,1736^2 + 0,1531^2)}{2}\right)} = 0,1637 \%$$

- *Coefficient de sensibilitat:*

Es va modificar la FVm afegint a la barreja de reacció més o menys quantitat de volum de mostra. El volum de mostra va variar de 0,090 mL a 0,110 mL en intervals de 0,005 mL. Per cadascuna de les condicions anteriors es va mesurar per triplicat la concentració catalítica de la CK del material SCH II. A la Taula 43 es mostren els resultats obtinguts.

Taula 43. Valors de la concentració catalítica de la CK segons el volum de mostra.

V (mL)	FVm (%)	Concentració catalítica ($\mu\text{kat/L}$)			Mitjana
0,090	90,1	4,571	4,580	4,612	4,588
0,095	95,2	4,774	4,806	4,779	4,786
0,100	100,0	4,972	4,951	5,023	4,982
0,105	104,8	5,160	5,288	5,231	5,227
0,110	109,5	5,443	5,461	5,430	5,445

A la Figura 31 es representen els valors de les mitjanes en % de la concentració catalítica de la CK en front la FVm. Es va obtenir un coeficient de sensibilitat del 0,89 % per cada variació de l'1 % de la FVm.

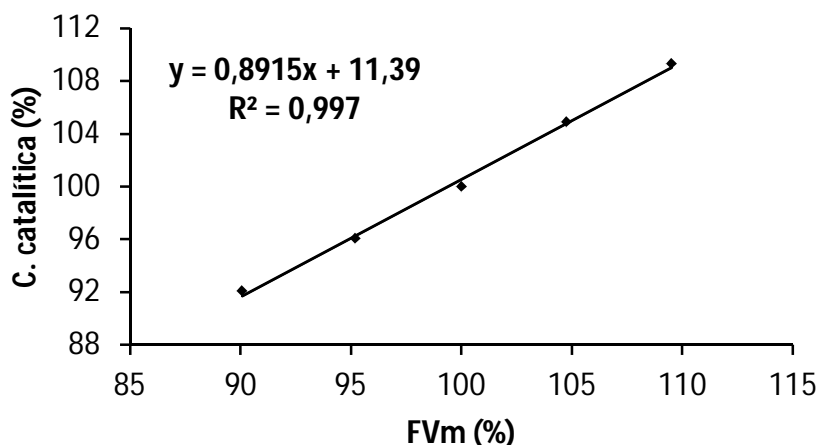


Figura 31. Variació de la concentració catalítica (%) de la CK segons la fracció de volum de mostra.

4.2.3.4.3. Temps de preincubació

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

Una vegada s'afegeix la mostra a la cubeta de reacció, on ja hi ha els 2 mL de la solució de reacció, s'ha de deixar incubar durant 3 minuts per a que la barreja de reacció assoleixi els 37 °C i l'enzim es pugui reactivar. No hi ha requisit per el valor de la incertesa associada a aquest temps.

- *Incertesa estàndard:*

No es va poder calibrar el cronòmetre del laboratori per la manca de disponibilitat d'un rellotge patró, però es va estimar la incertesa estàndard del temps de preincubació a partir de l'experiència en la sistemàtica de treball. Es va establir un interval d'error de 10 segons i es va suposar que els valors del temps adoptaven una distribució rectangular. La incertesa estàndard (u_s) es va calcular:

$$u_s = 10/\sqrt{3} = 5,77 \text{ segons}$$

- *Coefficient de sensibilitat:*

Es va mesurar per triplicat la concentració catalítica de la CK del material SCH II per cadascun dels condicions temps de preincubació següents 1, 2, 3, 5, 7 i 9 minuts. L'experiment es va repetir tres vegades, obtenint-se resultats molt similars. Un dels resultats obtinguts es mostra a la Taula 44.

Taula 44. Valors de la concentració catalítica de la CK segons el temps de preincubació.

Temps (min)	Concentració catalítica ($\mu\text{kat/L}$)			Mitjana
1	5,132	5,139	5,180	5,135
2	5,171	5,146	5,144	5,154
3	5,223	5,217	5,186	5,209
5	5,226	5,234	5,236	5,232
7	5,362	5,303	5,277	5,314
9	5,277	5,316	5,271	5,288

Es va observar com la concentració catalítica augmentava proporcionalment amb el temps de preincubació fins, aproximadament, els 7 minuts, a partir d'aquest moment, començava a disminuir. Per calcular el coeficient de sensibilitat del temps de preincubació es van representar a la Figura 32 els valors de les mitjanes en front del temps d'incubació amb una relació lineal, es van excloure els valors corresponents als 9 minuts de preincubació. A partir de la mitjana dels coeficients de sensibilitat calculats dels tres experiments es va obtenir un coeficient de sensibilitat del 0,515 % de variació de concentració catalítica per minut. Això va equivaldre a un 0,009 % de variació per segon.

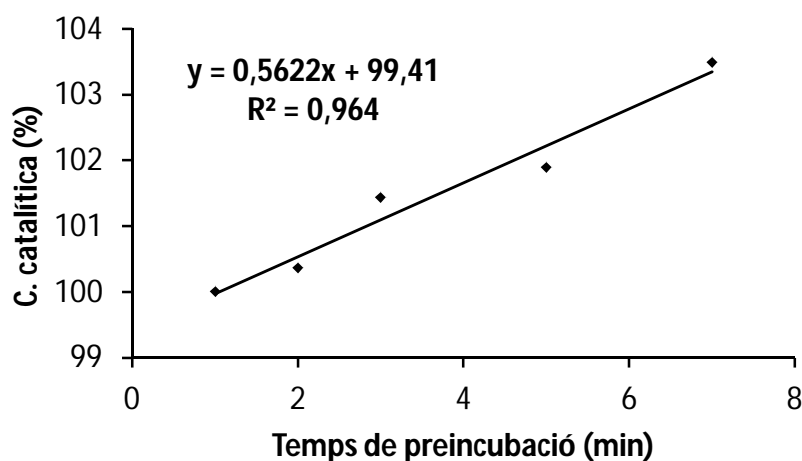


Figura 32. Variació de la concentració catalítica (%) de la CK segons el temps de preincubació.

4.2.3.4.4. Cubetes

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

El volum de la barreja final de reacció és 2,3 mL, per tant es van utilitzar cubetes mida macro de vidre amb una capacitat de 3,5 mL.

- *Incertesa estàndard:*

Donat que sempre es va utilitzar el mateix model de cubeta per fer les mesures, les variacions que es puguin generar estan incloses dins del factor d'incertesa de la variabilitat en condicions intermèdies de mesura. Així doncs, es van descartar les cubetes com a font individual en la contribució a la incertesa de mesura.

Al igual que amb l'estudi del procediment de mesura de GGT, es van realitzar comparacions de la concentració catalítica de la CK del SCH II utilitzant cubetes mida macro, com especifica el procediment de mesura, i cubetes mida micro (1,4 mL). En aquest cas es va dispensar la meitat del volum de la barreja final de reacció, mantenint la proporció entre volum de mostra i volum de reactius. Es va mesurar per quadruplicat la concentració catalítica de la CK del SCH II per cadascuna de les condicions: cubeta mida macro i volum de la barreja final de reacció de 2,30 mL, cubeta mida macro i volum de 1,15 mL, i cubeta mida micro i volum de 1,15 mL. A la Taula 45 es mostren els resultats de la concentració catalítica obtinguts.

Taula 45. Valors de la concentració catalítica de la CK segons la cubeta utilitzada i el volum de la barreja de reacció dispensat.

Cubeta	Volum	Concentració catalítica ($\mu\text{kat/L}$)				Mitjana
Macro	2,30	4,813	4,822	4,827	4,804	4,817
Macro	1,15	4,810	4,843	4,837	4,847	4,834
Micro	1,15	4,900	4,885	4,862	4,882	4,882

Es van trobar diferències significatives entre els valors de concentració catalítica obtinguts fent servir la cubeta mida macro (2,3 mL) i els obtinguts utilitzant la cubeta mida micro, obtenint-se una $p = 0,01$ per una anàlisi ANOVA amb contrast *Scheffé* ($\alpha = 0,05$). Els valors de concentració catalítica amb cubeta mida micro eren, aproximadament, un 1,3 % més elevats que amb la macro. Així doncs, es va concloure que tant la mida de la cubeta com el volum final de la barreja de reacció tenien un efecte en la concentració catalítica de la CK.

4.2.3.5. Factors de correcció

4.2.3.5.1. Blanc de reactiu

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

El valor del blanc de reactiu ha de ser $< 2,5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ($0,091 \mu\text{kat/L}$) i s'ha de restar del valor obtingut per cada mostra.

- *Incertesa estàndard:*

En el cas del blanc de reactiu, es va considerar que una correcció realitzada amb valor numèric igual per totes les mesures realitzades no tenia cap incertesa associada.

Es va realitzar un estudi per estimar la variabilitat dels valors del blanc de reactiu obtinguts amb el procediment de mesura de referència. Es van realitzar tres mesures del blanc de reactiu en quatre sèries independents. Els valors dels resultats obtinguts es mostren en la Taula 46.

Taula 46. Valors de la concentració catalítica de la CK del blanc de reactiu.

Sèrie	Concentració catalítica BR ($\mu\text{kat/L}$)			Mitjana
1	0,0057	0,0057	0,0181	0,0098
2	0,0121	0,0122	0,0357	0,0202
3	0,0074	0,0198	0,0106	0,0126
4	0,0038	-0,0031	0,0091	0,0043

Aquests resultats mostren que la variació entre els valors del blanc de reactiu era molt elevada, es va obtenir un CV del 80 % (el valor negatiu es va considerar com a 0). Si es considerava la variació entre les mitjanes de cada sèrie, s'obtenia un CV = 56 %, tot i que, la disminució de la variabilitat dels valors del blanc de reactiu no era molt important, es decidí fer les mesures del blanc de reactiu per duplicat en cada sèrie analítica i utilitzar la mitjana de les mesures del blanc per corregir el valor de l'activitat de les mostres.

4.2.3.5.2. Volum dispensat

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

A partir del requisit de l'apartat 4.1.3.4.2, es van establir els requisits per a la verificació dels volums dispensats per les pipetes automàtiques: la incertesa expandida de cada volum ha de ser $\leq 1\%$ ($k=2$) i l'error sistemàtic ha de ser $\leq 1\%$. Com a norma un error sistemàtic conegut ha de ser corregit, sempre que sigui possible.

- *Incertesa estàndard:*

La incertesa estàndard dels volums dispensats a la barreja de reacció ja es va tenir en compte com a font d'incertesa en l'estudi de la fracció de volum de mostra. L'error sistemàtic dels volums dispensats es va corregir, tot i que es complís amb el requisit. Així doncs, es va considerar que la incertesa estàndard del factor de correcció era la mateixa incertesa que la deguda al propi error sistemàtic.

La incertesa estàndard ($u_s(es)$) deguda al factor de correcció de l'error sistemàtic dels volums dispensats es va estimar fent servir el mateix model que a l'apartat 4.1.3.5.3. La incertesa del factor de correcció de l'error sistemàtic per cadascun dels volums dispensats es va estimar amb les dades de la verificació de les pipetes dels dies 07.04.11 i 14.07.11 (els

valors de les dades no variaven entre verificacions). Per cada volum dispensat es van realitzar deu pesades diferents. Després es va calcular l'error sistemàtic de cadascuna d'elles i es va estimar la incertesa de l'error sistemàtic de cada volum (u_{ses}) a partir de l'error estàndard de la mitjana (Taula 47).

Taula 47. Valors de l'error sistemàtic i de la incertesa estàndard de l'error sistemàtic de cada volum dispensat (u_{ses}).

DIA	07.04.11			14.07.11		
Volums (mL)	1,00	0,20	0,10	1,00	0,20	0,10
Error sistemàtic (%)	-0,67	-0,55	-0,90	-0,57	0,55	0,00
	-0,64	0,05	-0,90	0,06	0,10	0,40
	-0,52	0,15	-0,20	-0,54	0,55	0,30
	-0,58	0,10	-0,40	0,36	0,60	0,10
	-0,88	-0,05	-0,80	-0,36	0,40	0,10
	-0,88	0,10	-0,50	-0,17	0,25	0,50
	-0,79	0,15	-0,90	-0,33	0,80	0,20
	-0,85	0,20	-0,70	-0,41	0,35	0,60
	-0,65	-0,05	-0,30	-0,55	0,75	0,30
	-1,38	0,25	-0,60	-0,19	0,30	0,20
ds (%)	0,245	0,227	0,262	0,297	0,224	0,189
$u_{ses}: ds/\sqrt{n}$	0,078	0,072	0,083	0,094	0,072	0,060

Es va calcular la incertesa de l'error sistemàtic del volum total de la manera següent:

$$\text{Dia 07.04.11 } u_{ses}(Vt) = \sqrt{0,072^2 + 0,083^2 + (2 \times 0,078)^2} = 0,155 \% ,$$

$$\text{Dia 14.07.11 } u_{ses}(Vt) = \sqrt{0,072^2 + 0,060^2 + (2 \times 0,094)^2} = 0,162 \% .$$

Després es va calcular la incertesa estàndard de l'error sistemàtic dels volums dispensats a la cubeta de reacció per cadascuna de les verificacions:

$$\text{Dia 07.04.11 } u_{ses}(Vd) = 0,043 * \sqrt{\left(\frac{0,083}{0,10}\right)^2 + \left(\frac{0,155}{2,30}\right)^2} = 0,036 \%$$

$$\text{Dia 14.07.11 } u_{ses}(Vd) = 0,043 * \sqrt{\left(\frac{0,060}{0,10}\right)^2 + \left(\frac{0,162}{2,30}\right)^2} = 0,026 \%$$

i finalment, es va obtenir l'estimació de la incertesa estàndard deguda a l'error estàndard dels volums dispensats a la *FVm* segons el càlcul:

$$u_s(es) = \sqrt{((0,036)^2 + (0,026)^2) / 2} = 0,032 \%$$

4.2.3.6. Processament de les dades

4.2.3.6.1. Coeficient d'absorció molar

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

El coeficient d'absorció molar del NADPH a 339 nm i 37 °C és 630 m²/mol.

- *Incertesa estàndard:*

El calibratge del procediment de mesura de referència es realitza mitjançant un factor amb valor teòric. Aquest factor té en compte la fracció de volum de mostra, la longitud de la cubeta i el coeficient d'absorció molar. El primer i el segon components ja s'han discutit com a fonts d'incertesa.

El coeficient d'absorció molar és l'absorbància d'una solució 1 mol/L de NADPH a 339 nm i tenint en compte les condicions de mesura del procediment. El valor (630 m²/mol) descrit en el procediment de mesura de referència es va obtenir en condicions experimentals, però els autors no informen de la desviació dels valors del coeficient ni de la incertesa associada. Així doncs, no es va poder estimar la contribució a la incertesa de mesura per falta d'informació.

4.2.3.7. Variabilitat: imprecisió en condicions intermèdies

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

Habitualment, les mostres es valoren mesurant per triplicat la concentració catalítica de l'enzim en tres dies o sèries diferents, utilitzant un nou vial de mostra cada dia (n = 9). La imprecisió en condicions intermèdies de la mesura de la concentració catalítica de la CK es

va calcular a partir del CV obtingut de les mitjanes dels resultats de cadascun dels tres dies. Segons els requisits del LREC s'accepta un CV interdiari $\leq 2,5 \%$.

- *Incertesa estàndard:*

Es van recopilar tots els resultats dels assaigs realitzats al LREC des de novembre de 2008 fins al març de 2012, i es va obtenir el CV interdiari (variació entre els diferents dies que es mesura una mateixa mostra) per cadascuna de les mostres valorades ($n = 22$). El CV interdiari es calcula a partir de la desviació estàndard de les tres mitjanes dels triplicats (una mitjana per dia) i la mitjana de les tres mitjanes. Per obtenir la incertesa estàndard es va realitzar una mitjana de tots els valors dels CV (en forma de variància) i es va dividir per $\sqrt{3}$, ja que els CV s'obtenien de les tres mitjanes diàries. Així doncs, la $u_s = 0,703 \%$.

- *Coefficient de sensibilitat:*

El coeficient de sensibilitat es va considerar 1, ja que la incertesa estàndard es va obtenir a partir dels resultats de les mesures de concentració catalítica de la CK.

4.2.3.8. Tractament de les mostres

4.2.3.8.1. Temperatura de l'aigua de reconstitució del liofilitzat

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

Es va decidir reconstituir les mostres liofilitzades amb aigua destil·lada a una temperatura de $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

- *Incertesa estàndard:*

La incertesa estàndard de la temperatura de l'aigua es va estimar tenint en compte l'interval del requisit ($1 ^\circ\text{C}$). L'interval $\pm 1 ^\circ\text{C}$ es va considerar el valor de la incertesa expandida i es va suposar una distribució rectangular dels valors que prenia la temperatura de l'aigua de reconstitució. Per tant, la incertesa estàndard (u_s) es va calcular:

$$u_s = 1/\sqrt{3} = 0,577 ^\circ\text{C}$$

- *Coeficient de sensibilitat:*

Es van utilitzar les mostres SCH II, SCB II i LAC 1 per comprovar si la temperatura de l'aigua de reconstitució influïa en la concentració catalítica de la CK. Es van reconstituir tres vials de cadascun dels materials amb aigua destil·lada a 15, 20 i 25 °C, i es va mesurar per quadruplicat la concentració catalítica de la CK dels nou vials. A la Taula 48 es mostren els resultats obtinguts per cada material.

Taula 48. Valors de la concentració catalítica de la CK segons la temperatura de l'aigua de reconstitució del liofilitzat.

T °C	SCH II					SCB II				
	Concentració catalítica (µkat/L)				Mitjana	Concentració catalítica (µkat/L)				Mitjana
15	4,813	4,837	4,897	4,891	4,860	8,668	8,694	8,791	8,784	8,734
20	4,418	4,429	4,431	4,400	4,420	7,953	8,073	8,069	8,111	8,052
25	4,419	4,478	4,438	4,442	4,445	7,869	7,881	7,875	7,884	7,877

T °C	LAC 1				
	Concentració catalítica (µkat/L)				Mitjana
15	2,384	2,348	2,321	2,342	2,349
20	2,369	3,384	2,409	2,405	2,392
25	2,370	2,371	2,364	2,351	2,368

No es va poder obtenir un coeficient de sensibilitat general per totes les mostres. Les variacions de la concentració catalítica tenien un comportament diferent segons la mostra analitzada. Les diferències entre els valors de concentració catalítica eren significatives per les mostres SCH II i SCB II amb unes probabilitats $< 7,80 \times 10^{-9}$, per una anàlisi ANOVA ($\alpha = 0,05$). La temperatura de l'aigua de reconstitució tenia un efecte més important quan prenia valors < 20 °C, produint un increment de la concentració catalítica d'aproximadament un 9,15 % al disminuir la temperatura de l'aigua en 5 °C. A partir dels resultats es va estimar la contribució (u_s) de l'aigua de reconstitució del liofilitzat a la incertesa de mesura (temperatures < 20 °C):

$$u_s = 0,577 \text{ °C} \times 1,83 \text{ \% per °C} = 1,056 \text{ \%}$$

Per tant, s'havia de tenir en compte que aquest factor contribuïa a la incertesa de mesura, tot i que el seu efecte fos diferent segons la mostra.

4.2.3.8.2. Dilució de les mostres

- *Requisits del procediment de mesura de referència:*

Totes aquelles mostres amb un increment d'absorbància $> 0,0067 \text{ s}^{-1}$ (concentració catalítica $> 24,6 \mu\text{kat/L}$), s'han de diluir amb solució salina. Es feia una dilució 1:2 i si fos necessari una 1:4 però mai s'ha de sobrepassar aquesta dilució. El valor obtingut de la mesura de concentració catalítica s'ha de multiplicar pel factor de dilució corresponent.

- *Incertesa estàndard:*

La incertesa estàndard de la dilució de la mostra es va estimar com s'explica a l'apartat 4.1.3.8.4.

- *Coefficient de sensibilitat:*

Es van mesurar per triplicat tres mostres de sèrum humà amb concentracions catalítiques d'aproximadament 11, 24 i 26 $\mu\text{kat/L}$, sense diluir-les i realitzant les dilucions, 1:1, 1:2 i 1:4 tant amb solució salina (SS) com amb solució diluent d'enzims (Sde). A la Taula 49 es mostren els valors de la concentració catalítica de les mitjanes dels replicats obtinguts en les condicions descrites anteriorment.

Taula 49. Valors de les mitjanes de la concentració catalítica ($\mu\text{kat/L}$) de la CK per cadascuna de les dilucions. (SS) representa la solució salina i (Sde) la solució diluent d'enzims.

Dilució	SH 1		SH 2		SH 3	
	SS	Sde	SS	Sde	SS	Sde
1:1	11,016		24,354		26,206	
1:1,1	10,737	10,695	24,243	23,921	26,044	26,316
1:2	10,755	11,237	25,379	25,970	27,433	28,087
1:4	10,760	11,133	26,696	25,927	29,244	29,766

En general, els resultats mostren valors equivalents de concentració catalítica tant per la mostra sense diluir com per la mostra amb una dilució 1:1,1. Però a partir d'una dilució 1:2, els valors de concentració catalítica eren significativament més elevats, amb una $p < 0,005$ per una anàlisi ANOVA ($\alpha = 0,05$), augmentant proporcionalment amb el valor de la dilució, a excepció de la mostra SH 1 ($p = 0,48$).

Per altra banda, la utilització de solució diluent d'enzims, com diluent, en comptes de solució salina, no va millorar les diferències observades entre els valors de concentració catalítica obtinguts per cadascuna de les dilucions realitzades.

A la Figura 33 es representen els valors obtinguts de la concentració catalítica de la CK de les mostres SH 2 i SH 3 en % amb solució salina com diluent. Es va obtenir un coeficient de sensibilitat del 3,5 % per mL de diluent.

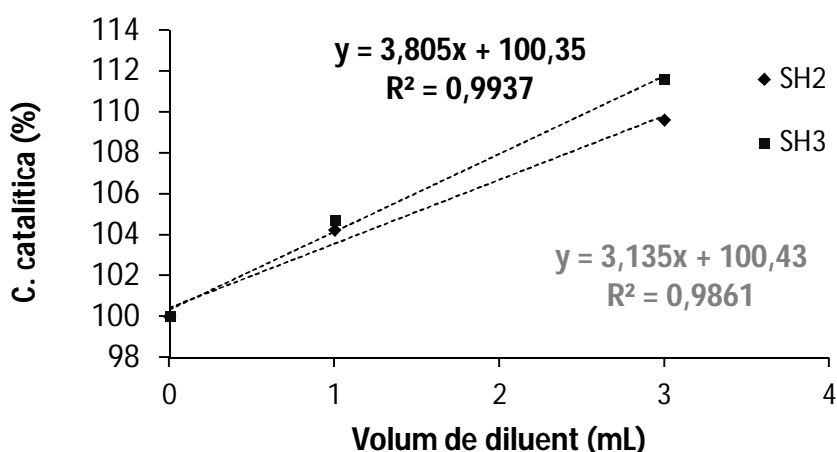


Figura 33. Variació de la concentració catalítica (%) de la CK segons la dilució amb solució salina.

A partir d'aquests resultats es va recomanar realitzar una dilució 1:1,1 sempre que fos necessari, ja que els valors de concentració catalítica es mantenen constants i la incertesa associada a aquesta dilució era insignificant ($u_s = 5,0 \times 10^{-4} \times 3,5 = 1,8 \times 10^{-3} \%$). Però, si aquesta dilució no era suficient per mesurar la concentració d'enzim i es realitzes una dilució 1:2 o 1:4, s'havia de tenir en compte l'error sistemàtic positiu que generava en la concentració catalítica de les mostres, que era d'un 7 % i d'un 10,5 %, respectivament. Per altra banda, la incertesa estàndard associada a les dilucions 1:2 i 1:4 era de 0,02 % i de 0,05

%, respectivament. Finalment, es va recomanar no realitzar una dilució $> 1:4$, ja que el valor assignat a la mostra tindria un error sistemàtic positiu $> 10,5\%$.

4.2.3.9. Estabilitat de l'enzim CK a les mostres

Per conèixer la incertesa deguda a l'estabilitat de les mostres, es van estudiar 8 materials comercials diferents: 4 sèrums control (SCH II, SCB II, LAC 2 i LAM), 2 calibradors (CFAS i A plus) i 2 materials controls de programes d'avaluació externa de la qualitat (RELA B i SEQC). Totes les mostres eren materials liofilitzats conservats a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, exceptuant el material LAM que era líquid i conservat a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Es va fer servir un únic vial per mostra del qual es van realitzar tres alíquotes que es van conservar a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ sense exposició lumínica, a temperatura ambient sense exposició lumínica i a temperatura ambient amb exposició lumínica. Se'ls hi va mesurar per triplicat (vials amb 5 mL de mostra) o per duplicat (vials amb 3 mL de mostra) la concentració catalítica de la CK a les 0, 3, 6, 24 i 48 hores després de la reconstitució del liofilitzat o de la descongelació del material. A la Figura 34 es representen els valors de les mitjanes de la concentració catalítica en % obtinguts per cada una de les 8 mostres analitzades.

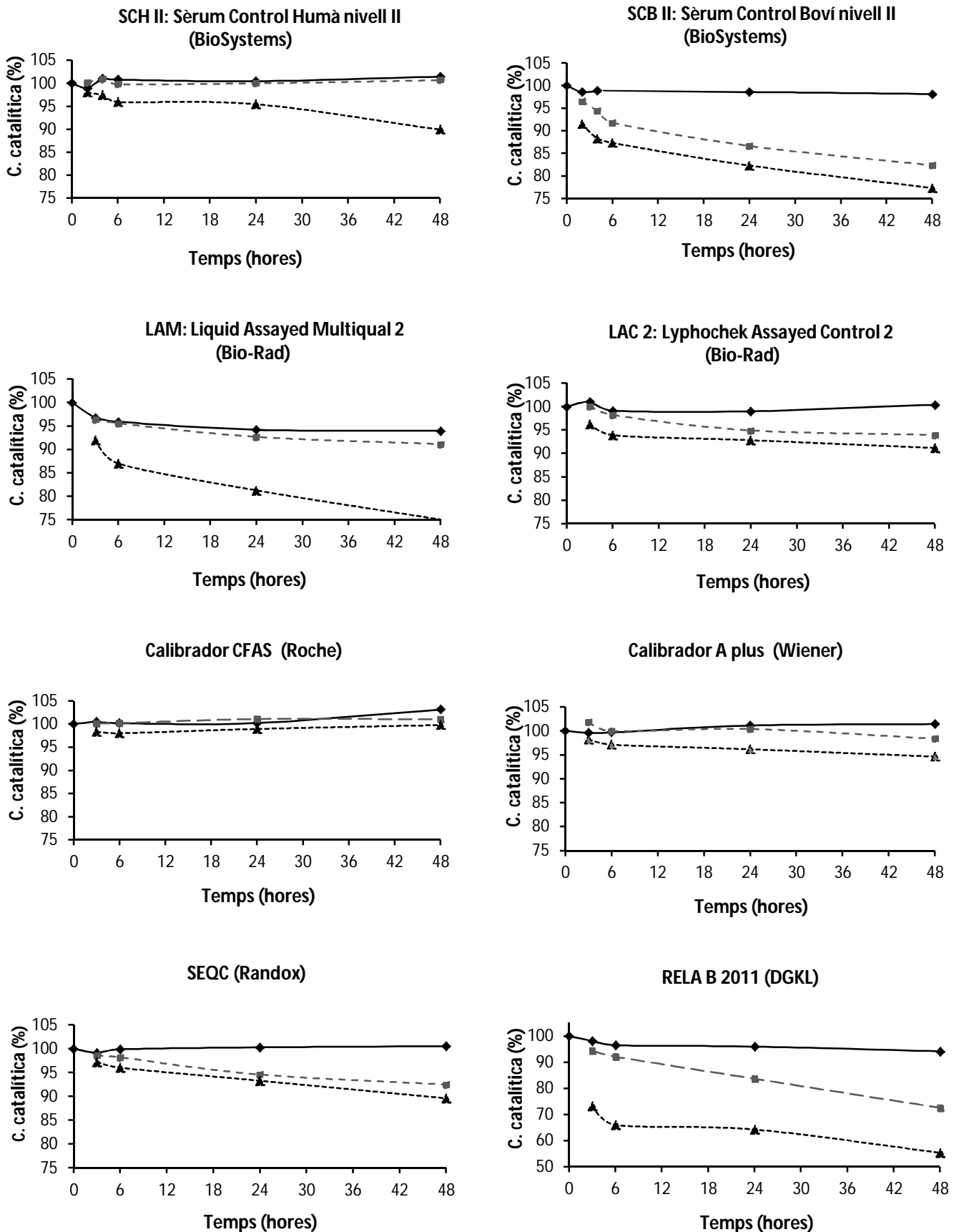


Figura 34. Estabilitat de diversos materials comercials durant 3 dies a 4 °C sense exposició lumínica (rombes amb línia contínua), a temperatura ambient sense exposició lumínica (quadrats amb línia discontinuata) i a temperatura ambient amb exposició lumínica (triangles amb línia discontinuata puntejada).

En general, es va observar una bona estabilitat de la CK en totes las mostres conservades a 4 °C, exceptuant el material líquid (LAM) en el que la seva concentració catalítica disminuïa en un 4 % després de 6 hores de la seva descongelació. L'emmagatzematge de las mostres a temperatura ambient produïa una inestabilitat variable de l'enzim segons el material analitzat. El SCB II a las 6 hores de la seva reconstitució presentava valors de concentració catalítica un 8 % més baixos. L'exposició de las mostres a la llum va generar una disminució de la concentració catalítica de la CK en proporcions molt variables segons el material. Es van observar pèrdues de fins un 34 % de la concentració catalítica a las 6 hores de la reconstitució del material RELA B. El calibrador CFAS era el material que presentava una major estabilitat de l'enzim CK per les tres condicions estudiades.

Es va estimar la incertesa de mesura produïda per la inestabilitat de les mostres tenint en compte que, normalment, al laboratori les mostres es mesuren en un interval de 0 a 3 hores després de la reconstitució del liofilitzat o la seva descongelació, i la variabilitat de la concentració catalítica de la CK per hora. S'estima una incertesa estàndard (u_s) del temps de mesura de la mostra, considerant una distribució rectangular, de:

$$u_s = \frac{(3 - 0)}{2 \times \sqrt{3}} = 0,866 \text{ hores}$$

Per estimar la contribució a la incertesa de mesura de la inestabilitat de les mostres per les tres condicions de conservació: temperatura a 4 °C, temperatura ambient i exposició lumínica, es van utilitzar els resultats dels materials en els que s'observava un efecte major en la concentració catalítica de la CK. Els materials considerats van ser: LAM per la conservació a 4 °C, SCB II per la conservació a temperatura ambient i RELA B per la incidència a la llum. La variabilitat de la concentració catalítica de la CK per hora obtinguda per cadascun dels materials considerats va ser: 0,684 %, 1,37 % i 4,36 %, respectivament. La contribució a la incertesa de mesura deguda a la inestabilitat de les mostres es va calcular multiplicant la incertesa estàndard (u_s) per la variabilitat de la concentració catalítica, obtenint-se uns valors de: 0,592 % per la conservació a 4 °C, 1,186 % per la conservació a temperatura ambient i 3,773 % per la incidència de llum a la mostra.

4.2.4. Estimació de la incertesa combinada

Una vegada estudiades totes les possibles fonts d'incertesa, i coneguts els valors de la incertesa estàndard i dels coeficients de sensibilitat de cadascuna d'elles, es va procedir a combinar-les per estimar la incertesa combinada, com es descriu a l'apartat 3.2.4 de Materials i Mètodes.

Es va valorar si les fonts que contribuïen a la incertesa de mesura eren o no independents entre elles. En el cas del procediment de mesura de la CK es va observar una dependència entre el pH i la temperatura. Per tant, es va utilitzar la fórmula de l'apartat 3.2.4.3 per estimar la incertesa combinada. La contribució a la incertesa de mesura de la correlació entre el pH i la temperatura es va calcular separatament de la següent manera:

$$\text{Correlació (pH, T}^\circ\text{C)} = 2 \cdot c_{S_{\text{pH}}} \cdot c_{S_{T^\circ\text{C}}} \cdot u_s(x_{\text{pH}}) \cdot u_s(x_{T^\circ\text{C}}) \cdot r(x_{\text{pH}}, x_{T^\circ\text{C}})$$

Primer, es va obtenir el coeficient de correlació experimentalment mesurant el pH de la solució de reacció en un interval de temperatures de 36 a 38,5 °C. A la Taula 50 es mostren els valors de pH obtinguts i el coeficient de correlació ($r(\text{pH}, T^\circ\text{C})$) calculat.

Taula 50. Dependència del pH amb la temperatura. Valor del coeficient de correlació ($r(\text{pH}, T^\circ\text{C})$).

Temperatura (°C)	pH
35,9	6,567
36,5	6,460
37,0	6,450
37,5	6,442
38,0	6,435
38,5	6,418
$r(\text{pH}, T^\circ\text{C})$	-0,7619

El valor de la correlació va ser:

$$\text{Correlació (pH, T}^\circ\text{C)} = 2 \cdot 27,7 \% \cdot 3,84 \% \cdot 0,02 \text{ pH} \cdot 0,03 \text{ }^\circ\text{C} \cdot -0,7620 = -0,0826,$$

La Taula 51 mostra els valors d'incertesa estàndard i els coeficients de sensibilitat que es van obtenir per cadascuna de les fonts d'incertesa estudiades. S'observa la contribució a la incertesa de mesura de cada font, obtinguda a partir de la multiplicació de la (u_s) pel seu coeficient de sensibilitat (cs). També es mostra el valor de la correlació entre el pH i la temperatura. El sumatori de totes les contribucions va generar una incertesa combinada pel valor de concentració catalítica de la CK de 0,95 %.

La incertesa deguda al tractament de les mostres no es va tenir en compte en el càlcul de la incertesa de mesura, degut a que aquesta variava segons el tipus de mostra mesurada. Aquest fet no significava que s'hagués de menysprear la contribució a la incertesa de mesura del tractament de les mostres. Com s'ha observat als experiments de la temperatura de l'aigua de reconstitució del liofilitzat, de l'estabilitat durant l'emmagatzematge de la mostra i de la incidència de llum a la mostra, la incertesa generada era important. A la Taula 52 es mostra l'efecte de la contribució del tractament de les mostres a la incertesa combinada de la CK.

Taula 51. Nous valors d'incertesa combinada (uc) de la mesura de CK tenint en compte la contribució del tractament de les mostres.

Tractament de les mostres	Mostra	Contribució u (%)	uc (%)
Conservació a 4 °C	LAM	0,592	1,12
Conservació a temperatura ambient	SCB II	1,186	1,52
Incidència de llum a la mostra	RELA B	3,773	3,89
Temperatura de l'aigua de reconstitució del liofilitzat (temperatura < 20 °C)	SCH II SCB II	1,056	1,42

Una de les maneres per reduir aquest efecte és estandarditzar al màxim el procés del tractament de les mostres: reconstituïnt les mostres amb aigua destil·lada a la mateixa temperatura, evitant el contacte de la mostra amb la llum, evitant l'emmagatzematge prolongat i utilitzant un nou vial de mostra per dia.

Taula 52. Dades de l'estudi de la compilació de la incertesa del procediment de mesura de referència primari de la CK. Es mostra la incertesa estàndard (u_s), el coeficient de sensibilitat (cs) i la contribució a la incertesa de mesura (u) per cadascuna de les fonts d'incertesa, i la incertesa combinada del procediment de mesura (uc). (ES) representa a l'error sistemàtic.

Fonts d'incertesa	Valor	Unitat	Tipus	Origen	u_s	cs (%)	Contribució u	Var (u^2) (%)	
Variabilitat (c. intermèdies)	2,10	%	A	Experimental	0,7035	1,00	0,7035	0,4949	
Exactitud de les absorbàncies	0,50	Abs	A i B	Certificat+ verificació	0,4789	1,00	0,4789	0,2294	
pH	6,50	pH	B	Certificat del patró	0,0173	27,2	0,4704	0,2213	
Fracció de volum de mostra	4,35	%	A	Calibratge	0,1637	0,89	0,1459	0,0213	
Temperatura	37,0	°C	B	Calibratge	0,0300	3,84	0,1153	0,0133	
Longitud d'ona	339	nm	B	Certificat del patró	0,1732	0,35	0,0606	0,0037	
Linealitat	100	%	A	Verificació	0,0584	1,00	0,0584	0,0034	
Temps de preincubació	180	s	B	Experimental	5,7735	0,01	0,0495	0,0025	
Volums dispensats (ES)		%	A	Calibratge	0,0315	1,00	0,0315	0,0010	
Massa dels reactius	SR	g	B	Calibratge	0,0582	0,00	0,0000	0,0000	
	SI-1,13	g	B	Calibratge	0,0324	0,00	0,0000	0,0000	
Arrasament	SR-40	mL	B	Certificat	0,0235	0,00	0,0000	0,0000	
	SI-10	mL	B	Certificat	0,0044	0,00	0,0044	0,0000	
Massa d'aigua de reconstitució	5,00	g	B	Calibratge	$6,5 \times 10^{-5}$	1,00	0,0001	0,0000	
Correlació entre pH i temperatura								-0,0826	
								0,95	uc (%)

4.2.5. Estimació de la incertesa expandida

La incertesa expandida dels valors obtinguts de la mesura de la concentració catalítica de la CK mitjançant el procediment de mesura de referència es va estimar a partir de la incertesa combinada i d'un factor de cobertura.

El factor de cobertura ve determinat per la distribució de probabilitats i pels graus de llibertat.

- *Distribució de probabilitats*: es va suposar que els valors de la concentració catalítica es distribuïen normalment. Es va realitzar el test de normalitat per els valors de les mostres SCH II (n = 65) i el material de referència de CK (n = 58), obtenint-se unes probabilitats del 0,06 i 0,19, respectivament, per un nivell de confiança del 95 %.
- *Graus de llibertat*: per les fonts d'incertesa amb més contribució a la incertesa de mesura es van estimar els graus de llibertat (ν) com es descriu a l'apartat 3.2.5 de Materials i Mètodes. Es va utilitzar la fórmula de *Welch-Satterthwaite* per obtenir els graus de llibertat efectius (ν_{eff}). Els ν_{eff} calculats van ser 27.

Si la distribució dels valors de la concentració catalítica era normal, els graus de llibertat eren $>$ a 20 per un nivell de confiança del 95 %, el factor de cobertura utilitzat va ser $k = 2$. Per tant, la incertesa expandida (U) es va estimar:

$$U = 2 \times 0,95 = 1,90 \%$$

L'estimació de la incertesa expandida del procediment de mesura de referència de la CK es resumeix a la Taula 53, on únicament es mostren les fonts d'incertesa que tenen una contribució significativa a la incertesa de mesura, juntament amb els seus graus de llibertat.

Taula 53. Fonts d'incertesa amb una contribució significativa a la incertesa de mesura del procediment de mesura de l'enzim CK. Es mostra els graus de llibertat (ν), la incertesa estàndard (u_s), el coeficient de sensibilitat (cs) i la contribució a la incertesa de mesura (u) per cadascuna de les fonts d'incertesa, la incertesa combinada (uc) i la incertesa expandida (U) del procediment de mesura i els graus de llibertat efectius (V_{eff}).

Fonts d'incertesa	Valor	Unitat	Tipus	origen	ν	u_s	cs (%)	Contribució u (%)	Var (u^2) (%)	
Variabilitat (c. Intermèdies)	2,10	%	A	Experimental	21	0,7035	1,00	0,7035	0,4949	
Exactitud de les absorbàncies	0,50	Abs	A i B	Certificat + verificació	4	0,4789	1,00	0,4789	0,2294	
pH	6,50	pH	B	Certificat del patró	10	0,0173	27,2	0,4704	0,2213	
Fracció de volum de mostra	4,35	%	A	Calibratge	12	0,1637	0,89	0,1459	0,0213	
Temperatura	37,0	°C	B	Calibratge	10	0,0300	3,84	0,1153	0,0133	
Longitud d'ona	339	nm	B	Certificat del patró	10	0,1732	0,35	0,006	0,0037	
Linealitat	100	%	A	Verificació	4	0,0584	1,00	0,0584	0,0034	
Correlació entre pH i temperatura									-0,0826	
									0,95	uc (%)
									1,90	U (%) ($k = 2$)
									27	V_{eff}

5. DISCUSSIÓ

El concepte d'incertesa va ser introduït en els anys 90 com a conseqüència de la falta de consens sobre la manera d'expressar l'exactitud dels resultats de mesura (62). La incertesa expressa el dubte existent sobre el valor del resultat d'una mesura, si aquest coincideix o no amb el valor verdader del mesurand. Segons el VIM (5), la incertesa es defineix com "el paràmetre no negatiu que caracteritza la dispersió dels valors atribuïts a un mesurand a partir de les informacions utilitzades". No tots els autors coincideixen amb aquesta definició, segons Thompson (63) no és correcte utilitzar el terme paràmetre per anomenar la incertesa. Un paràmetre descriu una propietat d'una població, però segons l'autor, en un context metrollògic els resultats obtinguts de les mesures representen a una mostra de la població i no a la població. La incertesa és una estimació basada en una mostra que representa els valors de les mesures, per tant, creu més convenient parlar d'estadístic en comptes de paràmetre. Va proposar la següent definició de la incertesa amb l'objectiu de fer-la més simple i entenedora: "la incertesa de mesura és la funció de densitat de probabilitat que caracteritza als possibles valors del mesurand".

Encara que el concepte d'incertesa de mesura és fàcil d'entendre, no succeeix el mateix alhora de realitzar l'estimació del seu valor en la pràctica diària del laboratori. Es descriuen dos maneres diferents per estimar la incertesa, la via *bottom up* i la via *top down*. La primera, estudia individualment les incerteses estàndard de cada font d'incertesa i les combina per estimar la incertesa de mesura. La segona, quantifica la incertesa estàndard d'un o més agrupaments de fonts d'incertesa i les combina per obtenir la incertesa de mesura. Actualment existeixen diversos documents amb diferents recomanacions per realitzar l'estimació de la incertesa de mesura. Alguns tenen una aplicació més general (39, 64, 65), i altres són més específics segons quin sigui el camp d'aplicació de les mesures realitzades, per exemple es diferencien les determinacions en química analítica (40), en física (66) i en el laboratori clínic (42, 53).

Per dur a terme l'objectiu d'aquest treball, l'estimació de la incertesa de mesura dels procediments de referència primaris per a la mesura de la concentració catalítica en un laboratori de referència, es va seguir la via *bottom up*, ja que la norma internacional ISO 17025, per la qual està acreditat el laboratori, exigeix conèixer la contribució de cadascuna

de les fonts d'incertesa a la incertesa de mesura. Aquest procés s'anomena "compilació de la incertesa". La via *bottom up* permet tant millorar el coneixement com identificar les etapes crítiques del procediment de mesura, d'aquesta manera es pot tenir un major control de les condicions crítiques de mesura per afavorir l'obtenció de resultats el més exactes possible. La compilació de la incertesa de mesura es va realitzar segons el document GUM del JCGM (39), com recomana ENAC (65) i la guia de l'estimació de la incertesa de l'*Eurachem* (40), per ser una eina didàctica que presenta diversos exemples pràctics.

Degut a l'elevat temps i esforç que comporta realitzar una estimació segons la via *bottom up*, no s'han realitzat molts estudis d'aquestes característiques en el camp de la bioquímica clínica. Únicament pels laboratoris de referència és un requisit indispensable conèixer la contribució de cadascuna de les fonts a la incertesa de mesura. Les empreses del diagnòstic *in vitro* han d'informar de la incertesa del valor del seus calibradors (17), i als laboratoris clínics se'ls recomana també conèixer la incertesa dels resultats de mesura si estan acreditats per la norma internacional ISO 15189 (67), però poden estimar-la a partir de la via *top down*, que és més ràpida i senzilla (68). La via escollida per estimar la incertesa de mesura d'un procediment ve donada per la quantitat de procediments que es realitzen en un laboratori, la finalitat de la mesura en la cadena de traçabilitat i el requisit metrollògic. Així doncs, en un laboratori de referència que sol realitzar poques determinacions i on els procediments de mesura són manuals, l'interessa saber quines són les condicions de mesura que generen inexactitud en els resultats per poder minimitzar els errors de mesura i informar d'una incertesa el menor possible. Per altra banda, en un laboratori clínic en el que es realitzen moltes determinacions de forma automatitzada és lògic utilitzar la via *top down* (69). Com es pot veure, els diversos estudis publicats pels laboratoris clínics (70, 71) estimen la incertesa de mesura de diferents analits mitjançant aquesta via. Les diferents fonts d'incertesa dels procediments de mesura de rutina queden agrupades en la variació preanalítica, la imprecisió intraserial i la interserial, la veracitat, el calibratge i, en alguns casos, els interferents. Les seves respectives incerteses estàndard són desviacions estàndard de valors del mesurand, en conseqüència els valors dels coeficients de sensibilitat són 1, així doncs, en aquesta via es simplifica el procés de combinació de les incerteses estàndard. Es destaca la importància de la fase preanalítica en el càlcul de la incertesa de mesura als laboratoris clínics. Els analits de les mostres dels pacients es poden veure alterats

durant l'extracció i el transport de la mostra, com també per la temperatura de conservació i el temps transcorregut fins la mesura. Aquestes accions no afecten a les mostres d'un laboratori de referència, ja que normalment són sèrums liofilitzats de materials calibradors i materials de control.

Tant la via *bottom-up* com la via *top-down* són correctes si el procés es realitza d'una manera acurada i tenint en compte totes les fonts d'incertesa sense que es donin duplicacions de la seva contribució. Alguns autors han demostrat (72) que el valor de la incertesa de mesura és pràcticament el mateix realitzant l'estimació mitjançant una o altra via. L'obtenció d'un valor d'incertesa similar a partir de dos estimacions diferents proporciona més fiabilitat i robustesa al resultat obtingut.

Quan es mesura un enzim a partir de la velocitat de conversió d'un substrat a producte, la propietat que es mesura, l'activitat catalítica, depèn totalment de les condicions de mesura. Per exemple, l'augment de la temperatura de reacció genera valors de concentració catalítica més elevats. Així doncs, és important mantenir les condicions de mesura dins dels intervals que defineix el procediment. Tot i això, sempre hi ha petites variacions de les condicions que poden generar dispersió en els valors del mesurand. La dispersió generada per les condicions de mesura es quantifica per estimar la incertesa de mesura del procediment. D'aquesta manera s'avalua la qualitat dels valors dels resultats, essent millor quan menor sigui el valor de la incertesa.

En aquest treball es presenta un model d'estudi de compilació de la incertesa de mesura dels procediments de referència primaris per la mesura de concentració catalítica en un laboratori de referència. Com exemples, s'han escollit els procediments de referència primaris per la mesura de concentració catalítica dels enzims GGT i CK. La compilació de la incertesa descriu totes les fonts d'incertesa del procediment de mesura, que generen dispersió dels valors del mesurand, i informa de la incertesa estàndard associada a cadascuna de les fonts. La compilació ha d'incloure el valor i les unitats de les fonts d'incertesa, el tipus d'estimació de la incertesa (tipus A o tipus B), els coeficients de sensibilitat, els graus de llibertat i la contribució a la incertesa de mesura (8).

El LREC forma part de la xarxa de laboratoris de referència del JCTLM, acreditats per l'execució de procediments de referència primaris per la mesura de concentració catalítica, junt amb tres laboratoris de la Unió Europea: el *Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien e.V* (Instand e.V) (73) i el *Deutsche Vereinte Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V* (DGKL) (74) d'Alemanya i el *Centro Interdipartimentale per la Riferibilità Metrologica in Medicina di Laboratorio* (CIRME) (75) d'Itàlia. A la Taula 54 es mostren les incerteses de mesura de la concentració catalítica de la GGT i la CK declarades pels laboratoris de referència de la xarxa del JCTLM (76). La incertesa de mesura s'expressa com incertesa expandida en forma de capacitat de mesura i calibratge. Pel que fa al LREC, les dades fora del parèntesi corresponen a les declarades a l'abast de l'acreditació i obtingudes el 2008. Les dades entre parèntesi són les obtingudes a l'estudi de compilació de la incertesa i les presentades en aquest treball. Com es pot observar, els valors de les incerteses estimades són lleugerament inferiors als valors de les incerteses declarades, indicant que el LREC té una millor exactitud en els resultats de mesura en els darrers anys, de la que informa. A més a més, els valors de les incerteses estimades es troben dins els valors acceptables per un laboratori de referència, ja que són del mateix ordre que els de la resta de laboratoris de referència del JCTLM, destacant la inferioritat de la CK.

Taula 54. Incertesa de mesura de la concentració catalítica de la GGT i la CK, expressada en forma de capacitat de mesura i calibratge (CMC), dels laboratoris de referència de la xarxa de laboratoris del *Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine* (JCTLM).

Laboratori	Sigles	Nació	Incertesa de mesura	
			CMC GGT (%)	CMC CK (%)
Laboratori de Referència d'Enzimologia Clínica	LREC	Espanya	2,9 (2,2)	3,3 (1,9)
Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien	Instand e.V	Alemanya	2,5	2,5
Deutsche Vereinte Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V	DGKL	Alemanya	2,4	2,4
Centro Interdipartimentale per la Riferibilità Metrologica in Medicina di Laboratorio	CIRME	Itàlia	2,5	2,5

Únicament s'han publicats estudis de compilació de la incertesa dels procediments de referència primaris per la mesura de la concentració catalítica dels enzims LDH i ALT pels laboratoris DGKL i CIRME (77, 78). El laboratori DGKL també mostra resultats, calculats experimentalment, de coeficients de sensibilitat de diverses fonts d'incertesa per altres enzims, com per exemple la GGT i la CK.

Els procediments de referència primaris per la mesura de concentració catalítica de la GGT i de la CK es basen en el mateix principi: l'espectrometria d'absorció molecular. La quantitat de producte format en les reaccions catalitzades, que es mesura a una determinada longitud d'ona, és proporcional a la concentració catalítica de l'enzim en la mostra. Això fa que les possibles fonts d'incertesa identificades pels dos procediments siguin pràcticament les mateixes. Aquestes fonts d'incertesa es van agrupar en 8 categories: els reactius, les solucions de reacció i d'inici, l'espectròmetre, les mesures, els factors de correcció, el processament de les dades, la variabilitat com imprecisió en condicions intermèdies i el tractament de les mostres.

El procediment de mesura de referència de l'enzim GGT (29) és senzill, ja que es basa en una única reacció que utilitza dos reactius diferents. La GGT transfereix el grup L- γ -glutamil del substrat L- γ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida a un altre substrat acceptor, la glicilglicina, que ahora actua de sistema tamponant de la reacció a pH 7,7 (37 °C). Es formen els productes 5-amino-2-nitrobenzoat, que té un màxim d'absorbància a 410 nm, i L- γ -glutamilglicilglicina.

El valor de la incertesa de mesura estimada per el procediment de mesura de la GGT és d'un 2,2 % ($k = 2$), molt similar als valors obtinguts per la resta de laboratoris de referència (Taula 54). Aquest fet corrobora la fiabilitat del mètode presentat en aquest treball per estimar la incertesa de mesura. De totes les fonts d'incertesa estudiades únicament 8 van contribuir a la incertesa de mesura, com s'observa a la Figura 35. Aquestes fonts d'incertesa, ordenades per la importància en la contribució, són: la variabilitat expressada com la imprecisió en condicions intermèdies de mesura amb un 35,6 %, l'interferent glicina amb un 22,8 %, l'exactitud de les absorbàncies amb un 17,1 %, la longitud d'ona amb un 12,4 %, el

pH amb un 8,61 %, la linealitat amb un 1,60 %, la fracció de volum de mostra amb un 1,18 %, i la temperatura amb un 0,68 %.

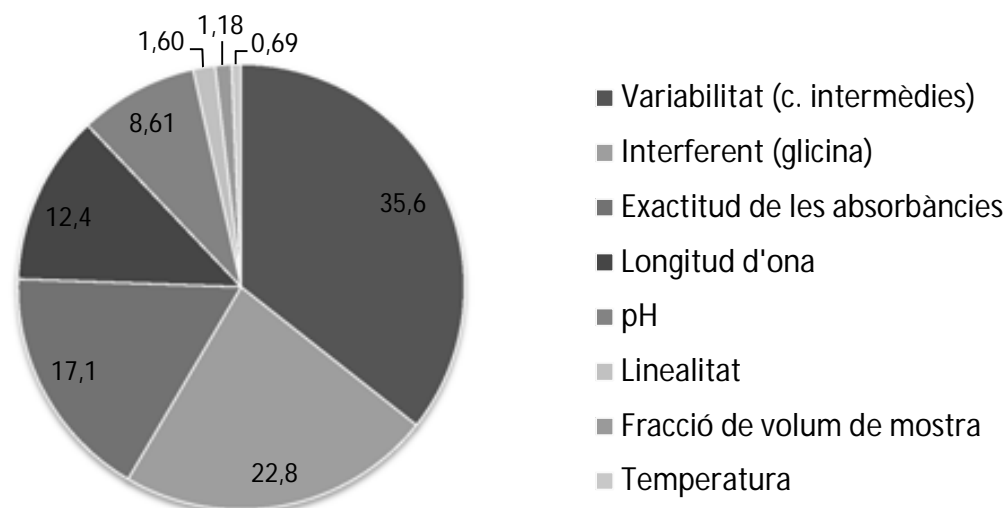


Figura 35. Contribució de les fonts d'incertesa significatives a la incertesa de mesura de la GGT. Es representen els valors en %. Les fonts d'incertesa de la llegenda estan ordenades per importància en la contribució a la incertesa de mesura.

La imprecisió en condicions intermèdies del procediment de mesura és un bon indicador de la dispersió general dels valors del mesurand. En la sistemàtica de treball del LREC, parlar d'imprecisió en condicions de repetibilitat o intermèdies no comporta moltes diferències, únicament la variable temps i, en alguns cassos, el vial de mostra. Tot i que això implica que es tingui en compte la contribució a la incertesa de mesura d'alguns factors per duplicat, també amplia la contribució d'altres factors, com per exemple, la línia base de l'espectròmetre i el temps de la cinètica i la incubació, que no va ser possible quantificar-los. A més a més, és millor informar d'un valor d'incertesa de mesura lleugerament superior que d'un valor infravalorat. Per altra banda, es coneix que la imprecisió pot trobar-se relacionada amb la concentració del mesurand, però en aquest cas no es van trobar indicis d'heteroscedasticitat per el rang de linealitat de 0,25 a 4,17 $\mu\text{kat/L}$. Així doncs, s'informa de la mateixa incertesa de mesura per totes les mostres amb concentracions dins del rang mesura.

A la categoria dels reactius es van estudiar les característiques dels reactius necessaris per realitzar les solucions de treball del procediment de mesura. Per preparar les solucions per la mesura de la GGT es necessitava aigua destil·lada, i els reactius N-glicilglicina, per la solució de reacció, i L- γ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida, per la solució d'inici. En aquest cas els dos reactius posseeixen un interferent que actua d'inhibidor de l'activitat de la GGT, la glicina present amb una concentració $< 0,15\%$ (límit del requisit del procediment de mesura $< 0,10\%$) i el 5-amino-2-nitrobenzoat present amb una concentració $< 0,10\%$, respectivament. A partir de l'estudi de la variació de la concentració catalítica de la GGT segons el % de la concentració d'interferents en el reactiu es van obtenir els coeficients de sensibilitat d'un $12,4\%$ per la glicina i d'un $2,92\%$ per el 5-amino-2-nitrobenzoat. Aquest resultat mostren com el primer interferent té un efecte en la concentració catalítica de l'enzim molt més important que el segon (79), reflectint-se en els valors de les seves incerteses estàndards, d'un $0,539\%$ i d'un $0,084\%$. A partir d'aquestes dades es va arribar a la conclusió que les variacions en la concentració catalítica generades pels diferents lots d'un reactiu eren degudes a la concentració de l'interferent. Les diferències entre lots venen donades per la concentració d'impureses existents, que només influiran en el procediment de mesura si aquestes generen alguna interferència amb el mateix. Així doncs, els lots de reactiu d'N-glicilglicina amb una concentració similar de glicina generaran variacions petites en la concentració catalítica de la GGT i seran importants si les concentracions de glicina són molt diferents. En un estudi presentat per altres autors (77) on comparen els valors d'un mateix material obtinguts durant un any i mig mitjançant dos lots de reactiu d'N-glicilglicina, s'observen diferències d'aproximadament un $2,50\%$ entre els valors de concentració catalítica dels dos lots de reactiu, confirmant l'efecte de la glicina. Tenint en compte que el coeficient de sensibilitat indica que una variació d'1 % de glicina comporta canvis d'un $12,4\%$ de la concentració catalítica, les diferències en un $2,50\%$ d'activitat són produïdes per una variació d'un $0,20\%$ de glicina entre els dos lots. La variació de glicina observada entre lots és més elevada d'un $0,15\%$, possiblement degut a la diferència de temps en la realització de les mesures amb els dos lots de reactiu.

Per evitar errors de mesura és important realitzar un bon manteniment de l'espectròmetre i verificar les diferents característiques tècniques. Aquestes es van tractar com a possibles fonts d'incertesa, i es va observar que l'exactitud de l'absorbància, la longitud d'ona i la linealitat tenien una contribució significativa a la incertesa de mesura. L'estimació de les incerteses de cada factor es va realitzar a partir de les dades obtingudes en les diferents verificacions de l'espectròmetre. Per l'exactitud de l'absorbància es va estimar una incertesa estàndard de 0,466 %. Degut a les característiques de l'analit, l'absorbància es mesura diverses vegades en funció del temps, per tal d'obtenir una cinètica enzimàtica. Això implica treballar amb diferents valors d'absorbància cadascun amb una incertesa diferent. Per tant, com es té en compte un increment d'absorbància es va decidir realitzar un promig de les incerteses dels diferents valors d'absorbància. Per la longitud d'ona es va obtenir experimentalment el coeficient de sensibilitat amb un valor de 3,43 % per nm, que va ser similar a l'obtingut pel laboratori DGKL (77), 3,25 % per nm. Les variacions en la concentració catalítica de la GGT són elevades ja que el producte indicador, el 5-amino-2-nitrobenzoat, no es pot llegir a la longitud d'ona (380 nm) en que posseeix el seu màxim d'absorbància, ja que a la concentració de treball els valors mesurats sobrepassen el valor límit d'absorbància de l'espectròmetre (79, 80). Així doncs, la lectura es realitza a 410 nm, que es troba situada en un pendent de l'espectre d'absorbàncies del producte indicador. Per tant, petites fluctuacions de la longitud d'ona pròpies de l'instrument augmenten la variabilitat dels valors d'absorbància. Es va estimar una incertesa estàndard de 0,397 % per la longitud d'ona 410 nm. La linealitat és la característica de l'equip amb una contribució a la incertesa de mesura més petita. El manteniment de les proporcions entre absorbància i concentració de producte és important per obtenir una mesura exacte de la cinètica enzimàtica i en conclusió de la concentració catalítica. Pèrdues de la linealitat a concentracions de producte elevades poden disminuir el pendent de la cinètica, obtenint resultats de concentració catalítica infravalorats. La incertesa estàndard estimada va ser d'un 0,142 %.

El pH és una font d'incertesa englobada a la categoria de les solucions de reacció i d'inici, ja que la solució de reacció s'ajusta a pH 7,70 una vegada preparada. El pH de la reacció canvia les característiques proteiques de l'enzim, afavorint una estructura iònica òptima en el centre actiu per realitzar la catàlisi. Com la variació de la concentració catalítica deguda a

canvis en el pH es coneguda, s'utilitzen substàncies amortidores en la reacció que ajuden a mantenir constant el valor de pH (81). En el cas de la GGT es va obtenir un coeficient de sensibilitat de 0,96 % per cada variació d'un 0,05 pH. En estudis presentats per altres autors (77), la concentració catalítica no es va veure tant influïda per la variació del pH, obtenint-se un valor de 0,22 % per 0,05 pH. Com l'estudi no proporcionava més informació sobre com s'havia obtingut el valor del coeficient de sensibilitat, no es va poder saber que generava aquesta diferència. Una possibilitat seria la diferència de comportament de les mostres analitzades per realitzar els dos experiments. La incertesa estàndard del pH va ser del 0,331 %, essent la cinquena font amb una contribució més important a la incertesa de mesura de la GGT.

Les dues últimes fonts d'incertesa, la fracció de volum de mostra i la temperatura, es troben agrupades en la categoria de les mesures i tenen una contribució petita, però significativa, a la incertesa de mesura de la GGT. La fracció de volum de mostra descriu la proporció de mostra en relació a la de reactiu, si la fracció augmenta també hauria d'incrementar-se amb la mateixa proporció la concentració catalítica mesurada, ja que les molècules d'enzim es troben distribuïdes homogèniament per tota la mostra. Els estudis realitzats demostren que la relació entre la fracció de volum de mostra i la concentració catalítica no és tan proporcional com es pensava, es va obtenir una variació de la concentració catalítica de la GGT del 0,92 % per cada canvi d'un 1 % de la fracció de volum de mostra. La incertesa estàndard estimada va ser del 0,123 %. La temperatura augmenta l'activitat catalítica dels enzims fins aproximadament els 40 °C, a partir d'aquesta temperatura l'estructura proteica de la molècula enzimàtica es comença a desnaturalitzar (hi ha excepcions) i en conseqüència, perd les propietats catalítiques (81). Per raons pràctiques s'ha estandarditzat la temperatura de mesura dels enzims a 37 °C. La incertesa estàndard estimada de la temperatura va ser del 0,094 %. El coeficient de sensibilitat calculat experimentalment va donar una variació de la concentració catalítica de la GGT del 3,12 % per °C, essent comparable a l'obtingut en l'estudi del laboratori DGKL (77) del 3,20 %.

El procediment de referència primari per la mesura de la CK (24) es basa en tres reaccions. La CK degrada el fosfat de creatina per formar creatina i ATP. Posteriorment, l'acoblament de dos reaccions, catalitzades pels enzims hexocinasa i glucosa-6-fosfat deshidrogenasa, generen el producte indicador NAPH, que té una màxim d'absorbància a 340 nm. Això, comporta l'ús de diversos reactius amb una funció específica en la reacció, com pot ser: substrat, activador enzimàtic, bloquejant dels inhibidors enzimàtics i tampó de pH, per que el procediment de mesura de la CK es pot considerar més complex que el de la GGT.

La incertesa de mesura estimada del procediment de mesura de la CK va ser d'1,9 % ($k=2$). El valor estimat al LREC és lleugerament més baix que els de la resta de laboratoris de referència del JCTLM, és a dir, el LREC obté resultats de mesura de la concentració catalítica de la CK més exactes. Les principals fonts d'incertesa amb una contribució significativa a la incertesa de mesura es representen a la Figura 36. Aquestes fonts d'incertesa, ordenades per la importància en la contribució, són: la variabilitat expressada com la imprecisió en condicions intermèdies de mesura amb un 50,1 %, l'exactitud de les absorbàncies amb un 23,2 %, el pH amb un 22,4 %, la fracció de volum de mostra amb un 2,16 %, la temperatura amb un 1,35 %, la longitud d'ona amb un 0,37 % i la linealitat amb un 0,34 %.

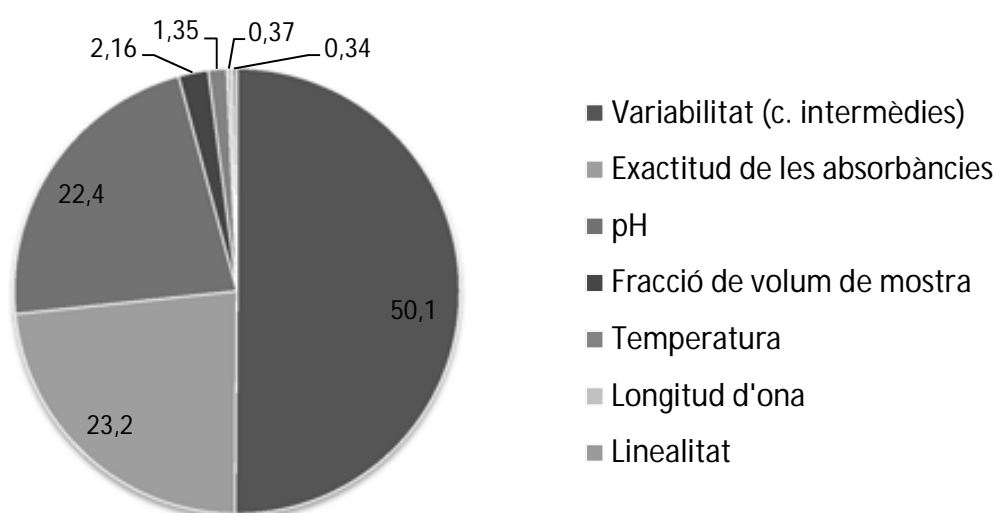


Figura 36. Contribució de les fonts d'incertesa significatives a la incertesa de mesura de la GGT. Es representen els valors en %. Les fonts d'incertesa de la llegenda estan ordenades per importància en la contribució a la incertesa de mesura.

Com es pot observar, les fonts d'incertesa amb una contribució significativa a la incertesa de mesura de la CK són pràcticament les mateixes que per el procediment de mesura de la GGT. La imprecisió en condicions intermèdies de mesura torna a ser la principal font d'incertesa, constituint la meitat de la contribució total, amb una incertesa estàndard del 0,704 %. Tampoc es van observar indicis d'heteroscedasticitat per l'interval de mesura d'1,50 a 11,2 $\mu\text{kat/L}$. Així doncs, la incertesa és la mateixa per totes les mostres amb concentracions dins del rang de mesura.

Les característiques de l'espectròmetre, exactitud de l'absorbància, longitud d'ona i linealitat, són importants per la mesura de l'activitat catalítica. La incertesa estàndard estimada per l'exactitud de l'absorbància a 340 nm va ser del 0,470 %, molt similar a la del procediment de la GGT per una longitud d'ona diferent. Això indica que l'equip és estable, ja que té un comportament semblant en la lectura d'absorbàncies a diferents longituds d'ona. En el procediment de mesura de la CK la longitud d'ona i la linealitat tenen una contribució petita a la incertesa de mesura. La incertesa estàndard de la longitud d'ona per la CK és similar a la de la GGT, d'aproximadament 0,144 %, però en el cas de la CK el coeficient de sensibilitat calculat va ser del 0,35 % per nm, generant una incertesa estàndard inferior per la longitud d'ona de 340 nm de 0,061 %. Aquesta diferència es deguda a la coincidència del valor de la longitud d'ona de mesura amb el màxim d'absorbància del producte de la reacció de la CK. Per altra banda, el coeficient de sensibilitat calculat experimentalment és comparable a l'obtingut pel laboratori DGKL (77) de 0,28 % per nm. Per la linealitat es va estimar una incertesa estàndard de 0,058 %.

El pH és la tercera font d'incertesa amb una contribució més significativa a la incertesa de mesura de la CK. Es va obtenir una variació de la concentració catalítica del 1,36 % per cada variació de 0,05 pH, essent lleugerament superior a la del laboratori DGKL (77) del 0,90 %. Les diferències observades poden ser degudes a la diferència en la proporció d'isoenzims de la CK en les mostres utilitzades en els estudis.

L'estudi de la fracció de volum de mostra va mostrar que la seva relació amb la concentració catalítica de la CK no era proporcional, el coeficient de sensibilitat va ser del 0,89 % per cada 1 % de fracció de volum de mostra. La incertesa estàndard estimada va ser del 0,146 %. Finalment, es va observar una variació de la concentració catalítica de la CK de 3,84 % per °C. Aquest valor és inferior respecte a l'obtingut pel laboratori DGKL (77) de 5,28 %. Possiblement, les proporcions d'isoenzim de la CK en les mostres utilitzades per realitzar els experiments no fossin les mateixes, generant la diferència en l'efecte observat de la temperatura.

Moltes de les fonts d'incertesa estudiades, com es pot observar a les figures anteriors, no es van tenir en compte per estimar la incertesa de mesura dels procediments estudiats per la seva escassa contribució. A l'estudi dels reactius es va veure que les variacions produïdes entre lots de reactius eren degudes a les diferents concentracions d'impureses. La concentració catalítica del mesurand només es veia afectada si algun component de les impureses actuava d'interferent en el procediment de mesura. Els laboratoris DGKL (77) i CIRME (78) han realitzat estudis de compilació de la incertesa pels procediments de mesura de l'ALT i de la LDH i van observar que la diferència de lots de reactiu era la principal contribució a la incertesa de mesura. Els resultats són comparables als de la GGT, on els interferents (font anomenada lots de reactiu) són la segona contribució. Però pel procediment de la CK, que no té interferents en els reactius, aquesta font no va ser significativa. Tot i que cada procediment enzimàtic s'ha d'estudiar individualment, la contribució dels lots de reactiu trobada pels altres laboratoris és molt gran (> 50 %). En aquest treball no s'ha pogut aprofundir en l'estudi dels lots de reactiu per la manca de diferents lots dels reactius implicats en la reacció. A més a més, el LREC és un laboratori jove que es va formar fa quatre anys, i per tant no disposa d'un gran historial de dades per poder comparar l'efecte dels lots de reactiu. S'ha de tenir en compte que les variacions entre lots de reactius són generades pels propis fabricants, un reactiu pot tenir un comportament més o menys estable segons quin sigui el seu fabricant. Així doncs, els laboratoris poden triar els fabricants que creguin més exigents alhora de reproduir els seus reactius per intentar minimitzar l'efecte dels lots, però sempre es veuran limitats.

Durant la preparació de les solucions de reacció i d'inici es poden produir variacions en la concentració final dels diferents reactius que les componen, degut a la pesada i a l'arrasament de les solucions. Segons el requisit del procediment de mesura la variació de la massa dels reactius en les solucions ha de ser $< 1\%$. Les incerteses estàndard de les dues fonts d'incertesa calculades complien amb el requisit pels dos procediments de mesura enzimàtics estudiats. La influència de la concentració de massa en la concentració catalítica dels mesurands va ser insignificant, tot i que per el procediment de mesura de la CK semblava que hauria de contribuir a la incertesa de mesura per la quantitat de reactius que utilitza.

Els diferents factors de correcció utilitzats en el càlcul dels resultats s'han de tenir en compte com a fonts d'incertesa. En aquest cas la concentració catalítica mesurada es corregia pel blanc de reactiu, la massa d'aigua de reconstitució de la mostra liofilitzada, el volum dispensat i la densitat de l'aigua de reconstitució de la mostra liofilitzada. El blanc de reactiu és el mateix valor numèric per totes les mostres analitzades en una mateixa sèrie analítica, per tant, no té cap incertesa associada. Per aquelles mostres mesurades en tres sèries diferents, les possibles variacions produïdes per aquesta font es recollien a la imprecisió en condicions intermèdies de mesura. La incertesa de la massa d'aigua de reconstitució era produïda per la balança, que tenia un valor no significatiu. A partir de la verificació de les pipetes realitzada al laboratori es podia corregir l'error sistemàtic del volum dispensat de mostra i reactius. La incertesa estàndard estimada de l'error sistemàtic pels dos procediments de mesura va ser del 0,030 aproximadament. Tot i que es va tenir en compte en la compilació de la incertesa, la seva exclusió no comportava canvis en el valor de la incertesa de mesura. Els efectes de la densitat es van suprimir utilitzant aigua destil·lada per la reconstitució a una temperatura de $20 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La categoria del processament de dades engloba les fonts d'incertesa següents: l'arrodoniment, el coeficient d'absorció molar i els valors aberrants. La primera font és menyspreable, ja que es mantenen les tres xifres significatives d'U/L donades per l'espectròmetre per realitzar les diferents correccions. El valor del coeficient d'absorció molar és únic per cada producte mesurat i depèn de la longitud d'ona, el pH i la temperatura. El coeficient actua com una constant en la fórmula per calcular la concentració catalítica, per tant, el seu valor no té cap incertesa associada. Existeix la possibilitat de que

cada laboratori es calculi experimentalment el seu propi valor del coeficient d'absorció molar. Això, permet complementar la verificació de l'exactitud de l'absorbància de l'espectròmetre, ja que és mesura l'absorbància d'una solució 1 M del producte. A més a més, possibles errors sistemàtics dels valors de concentració catalítica deguts a la inexactitud de l'absorbància es podrien veure corregits calibrant amb el coeficient d'absorció molar propi. És important destacar que el procediment de càlcul del coeficient hauria de ser el mateix per tots els laboratoris i hauria d'establir uns criteris d'acceptació. Es mostra un exemple en el procediment de mesura de la GGT a 30 °C (79), però no es va mencionar aquest aspecte quan es va publicar, posteriorment, el procediment de referència a 37 °C. Els valors aberrants són detectats, ja que les mostres es mesuren per triplicat i la variació del triplicat ha de ser < 1,5 % pel procediment de la GGT i < 2,0 % pel procediment de la CK. En totes aquelles situacions on la variabilitat del triplicat va ser superior, era degut a valors aberrants, per tant, el triplicat era descartat i es tornava a repetir.

Aquestes fonts d'incertesa que no contribueixen en la incertesa de mesura dels procediments de mesura de la concentració catalítica de la GGT i la CK, tampoc són significatives en els estudis realitzats pels altres laboratoris (77, 78).

La incertesa de mesura generada pel tractament de les mostres no es va afegir a la combinació de les incerteses estàndard de cadascuna de les fonts d'incertesa, ja que el seu valor varia segons el tipus de mostra. Però no tenir en compte aquest factor en la incertesa de mesura no significa que es menyspreï el seu efecte en la concentració catalítica. Com s'ha observat a l'apartat de resultats, existeixen diferents factors que poden influir en l'activitat catalítica, que són específics segons quin sigui l'enzim. Per la mesura de la GGT es va estudiar la influència de la temperatura de l'aigua de reconstitució (per mostres liofilitzades) i l'estabilitat de l'enzim a les mostres a 4 °C. Les incerteses estàndards estimades pel SCH II van ser del 0,054 i del 0,220 %, respectivament. Per la mesura de la CK també es van estimar les incerteses estàndard de la influència de la temperatura de l'aigua de reconstitució del liofilitzat (1,06 %), de l'estabilitat de l'enzim a les mostres a 4 °C (0,592 %) i a temperatura ambient (1,19 %) i la incidència de llum a la mostra (3,77 %). Així doncs, per tal de reduir aquest efecte és important estandarditzar el tractament de les mostres. Per exemple, reconstituir les mostres amb aigua destil·lada sempre a la mateixa temperatura, utilitzar un

vial nou de mostra per dia per evitar inestabilitats en l'activitat catalítica de l'enzim, conservar les mostres a 4 °C i evitar l'exposició a la llum de les mostres per la mesura de la CK. A més a més, conèixer la contribució a la incertesa de mesura de cadascuna de les mostres mesurades al laboratori requereix temps i esforç, el que comporta un cost econòmic més elevat.

El blanc de mostra no es corregeix de la concentració catalítica mesurada, però conèixer el seu valor és important, ja que informa de la presència d'interferents en la mostra. Per exemple, en el procediment de mesura de la CK és habitual que les mostres de sèrum humà continguin adenilat cinasa, un interferent que incrementa la concentració catalítica. Tot i que el procediment de mesura té inhibidors d'aquest enzim, no sempre és possible inhibir totalment la seva activitat, i es pot informar d'un valor de concentració catalítica més elevat del valor real. A més, si el valor del blanc de mostra és $> 1 \%$ del valor de concentració catalítica de la mostra, aquesta no pot ser utilitzada com a material de calibratge (24, 29).

La dilució de la mostra es necessària sempre que el valor de la concentració catalítica supera el límit de linealitat del procediment de mesura. La incertesa estàndard de la dilució ve determinada pel volum de mostra i diluent dispensat per les pipetes, que segons el criteri del procediment ha de ser $< 1 \%$. Segons el procediment estudiat aquestes variacions poden o no ser significatives. Per la mesura de la CK, dilucions de la mostra $> 1:1,1$ generaven un error sistemàtic positiu, a més volum de diluent el valor de la concentració catalítica de la mostra era més elevat. Així doncs, com recomanen altres autors (80) i nosaltres vàrem verificar s'ha de realitzar, sempre que sigui possible, una dilució 1:1,1 de la mostra abans d'una 1:2 o una 1:4, ja que la seva incertesa no es significativa i l'efecte del diluent a l'enzim és petit.

En aquest treball s'ha presentat el model *bottom up* per estimar la incertesa de mesura de la concentració catalítica dels enzims GGT i CK. Els resultats d'incertesa expandida i les fonts d'incertesa significatives són pràcticament les mateixes a les obtingudes pels laboratoris DGKL i CIRME, el que comporta una major fiabilitat dels resultats presentats. La comparació dels diferents valors d'incertesa de mesura és més correcte quan s'utilitza un mètode comú per estimar-la, ja que les fonts d'incertesa estudiades són les mateixes. Per tant, seria recomanable estandarditzar el procediment per estimar la incertesa de mesura en

els laboratoris de l'àmbit clínic. La guia GUM pot semblar els inicis d'aquesta estandardització, però té una aplicació molt general. Així doncs, crec que els procediments normalitzats per estimar la incertesa haurien de ser més específics segons sigui l'anàlit mesurat, l'objectiu de la mesura i el laboratori encarregat de la determinació. Com s'ha comentat anteriorment, no són el mateix les mostres ni l'objectiu d'un laboratori de referència que els d'un laboratori clínic.

6. CONCLUSIONS

1. L'estudi de la compilació de la incertesa dels procediments de referència primaris per la mesura de la concentració catalítica dels enzims ha demostrat:

- que el número de fonts d'incertesa amb una contribució significativa a la incertesa de mesura és reduït tenint en compte totes les possibles fonts d'incertesa estudiades.
- que les fonts d'incertesa amb una contribució significativa a la incertesa de mesura són pràcticament les mateixes per els procediments de mesura de referència dels diferents enzims, que es basen en el mateix principi de mesura l'espectrometria d'absorció molecular.

2. La incertesa de mesura estimada del procediment de referència primari de la IFCC per la mesura de la concentració catalítica de la γ -glutamilttransferasa va ser del 2,2 %, incertesa expandida amb un factor de cobertura ($k = 2$).

Les fonts d'incertesa amb una contribució significativa a la incertesa de mesura de la GGT, ordenades per importància, van ser la imprecisió en condicions intermèdies de mesura amb un 35,6 %, l'interferent glicina amb un 22,8 %, l'exactitud de les absorbàncies amb un 17,1 %, la longitud d'ona amb un 12,4 %, el pH amb un 8,61 %, la linealitat amb un 1,60 %, la fracció de volum de mostra amb un 1,18 % i la temperatura amb un 0,68 %.

3. La incertesa de mesura estimada del procediment de referència primari de la IFCC per la mesura de la concentració catalítica de la creatina cinasa va ser del 1,9 %, incertesa expandida amb un factor de cobertura ($k = 2$).

Les fonts d'incertesa amb una contribució significativa a la incertesa de mesura de la CK, en ordre d'importància, són la imprecisió en condicions intermèdies de mesura amb un 50,1 %, l'exactitud de les absorbàncies amb un 23,2 %, el pH amb un 22,4 %, la fracció de volum de mostra amb un 2,16 %, la temperatura amb un 1,35 %, la longitud d'ona amb un 0,37 i la linealitat amb un 0,34 %.

4. La identificació de les fonts d'incertesa significatives permet tenir un millor coneixement i un major control dels procediments de mesura estudiats, ja que possibles desviacions en l'exactitud dels resultats de mesura poden ser atribuïdes amb una elevada probabilitat a les variacions d'aquestes fonts o condicions de mesura.

5. La incertesa produïda pel tractament de les mostres líquides o liofilitzades és única per cada mostra, i en alguns casos pot ser molt significativa, per tant es recomana estandarditzar al màxim el procés de tractament per reduir el seu possible efecte.

BIBLIOGRAFIA

1. Asociación Española de Normalización (AENOR). Exactitud (veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición. Parte 1: Principios generales y definiciones. UNE 82009-1. Madrid: AENOR; 1998.
2. Barwick V, Prichard E, dirs. Terminologia per a les anàlisis. Introducció al VIM 3, 1a ed. In vitro veritas 2012. (<http://www.acclcat.cat/index.php>) (Consulta: 23.08.12)
3. Gella FJ. Metrología en el Laboratorio Clínico. 2ª ed. BioSystems, S.A. Barcelona, 2010.
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; Approved guideline – 2nd ed. EP5-A2, Vol. 24 No. 25. Wayne: NCCLS;2004.
5. Vocabulari Internacional de Metrologia. Conceptes fonamentals i generals i termes associats (VIM). Comitè comú per a les Guies en Metrologia (JCGM); 2008. (<http://www.acclcat.cat/index.php>) (Consulta: 23.08.12)
6. Moro M. Metrología: Introducción, conceptos e instrumentos. Servicio de publicaciones. Universidad de Oviedo. Oviedo, 1999.
7. Farrance I, Frenkel R. Uncertainty of measurement: A review of the rules for calculating uncertainty components through functional relationships. Clin Biochem Rev 2012;33:49-75.
8. EURACHEM/CITAC Guide. Traceability in chemical Measurement. A guide to achieving comparable results in chemical measurement. Eurachem, 2003. (<http://www.eurachem.org/>) (Consulta: 23.09.12)
9. International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC). ILAC Policy on traceability of measurement results. ILAC-P10:2002. ILAC, 2002. (<https://www.ilac.org/>) (Consulta: 23.09.12)
10. Panteghini M, Forest JC. Standardization in laboratory medicine: New challenges. Clin Chim Acta 2005;355:1-12.
11. Panteghini M. Traceability, reference systems and result comparability. Clin Biochem Rev 2007;28:97-104.
12. Armbruster D, Miller RR. The Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM): A global approach to promote the standardisation of clinical laboratory test results. Clin Biochem Rev 2007;28:105-113.
13. Asociación Española de Normalización (AENOR). Productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Medición de magnitudes en muestras de origen biológico.

Trazabilidad metrológica de los valores asignados a los calibradores y a los materiales de control. UNE-EN ISO 17511. Madrid: AENOR;2004.

14. Asociación Española de Normalización (AENOR). Productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Medición de magnitudes en muestras de origen biológico. Trazabilidad metrológica de los valores de concentración catalítica de los enzimas asignados a los calibradores y materiales de control. UNE-EN ISO 18153. Madrid: AENOR;2004.
15. White GH. Metrological traceability in clinical biochemistry. *Ann Clin Biochem* 2011;48:393-409.
16. Müller M. Implementation of reference systems in laboratory medicine. *Clin Chem* 2000;46(12):1907-1909.
17. Directiva 98/79/CE del Parlamento Europeo y del Consejo sobre Productos Sanitarios para Diagnóstico *In Vitro*. Diario Oficial de las Comunidades Europeas L 331/1.
18. Greg W, Myers GL, Lou M, Kahn SE, Ralf E, Thienpont LM *et al*. Roadmap for harmonization of clinical Laboratory measurement procedures. *Clin Chem* 2011;57(8):1108-1117.
19. Panteghini M, Ceriotti F, Schumann G, Siekmann L. Establishing a reference system in clinical enzymology. *Clin Chem Lab Med* 2001;39(9):795-800.
20. Thienpont LM, Van K, De Leenheer AP. Reference measurement systems in clinical chemistry. *Clin Chim Acta* 2002;323:73-87.
21. Siekmann L. Reference Systems in clinical enzymology. *eJIFCC* ;13(3):1-5.
22. Infusino I, Schumann G, Ceriotti F, Panteghini M. Standardization in clinical enzymology: a challenge for the theory of metrological traceability. *Clin Chem Lab Med* 2010;48(3):301-307.
23. Infusino I, Bonora R, Panteghini M. Traceability in clinical enzymology. *Clin Biochem Rev* 2007;28:155-161.
24. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Clerc-Renaud P, Ferrero CA, Férard G, *et al*. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C, Part 2. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of creatine kinase. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:635-642.
25. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Férard G, Ferrero CA, Frank PF, *et al*. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C, Part 5. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of aspartate aminotransferase. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:725-733.

26. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Férard G, Ferrero CA, Frank PF, *et al.* IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C, Part 4. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alanine aminotransferase. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:718-724.
27. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Clerc-Renaud P, Ferrero CA, Férard G, *et al.* IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C, Part 3. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of lactate dehydrogenase. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:643-648.
28. Schumann G, Aoki R, Ferrero CA, Ehlers G, Férard G, Gella FJ, *et al.* IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C, Part 8. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of α -amylase. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44:1146-1155.
29. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Férard G, Ferrero CA, Franck PF, *et al.* IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C, Part 6. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of γ -glutamyltransferase. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:734-738.
30. Schumann G, Klauke R, Canalias F, Bossert-Reuther S, Franck PF, Gella FJ, *et al.* IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C. Part 9. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alkaline phosphatase. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:1439-46.
31. Canalias F, Camprubí S, Sánchez M, Gella J. Metrological traceability of values for catalytic concentration of enzymes assigned to a calibration material. *Clin Chem Lab Med* 2006;44(3):333-339.
32. Cattozzo G, Albeni C, Franzini C. Harmonization of values for serum alkaline phosphatase catalytic activity concentration employing commutable calibration materials. *Clin Chim Acta* 2010;411:882-885.
33. Rami L, Roura M, Canalias F. Evaluation of commutability of several materials for harmonization alkaline phosphatase catalytic concentration measurements. *Clin Chim Acta* 2012;413:1249-1254.
34. Siekmann L. Requirements for reference (calibration) laboratories in laboratory medicine. *Clin Biochem Rev* 2007;28:149-154.
35. Asociación Española de Normalización (AENOR). Requisitos generales para la competencia de los Laboratorios de ensayo y calibración. UNE-EN ISO/IEC 17025. Madrid: AENOR;2005.

36. Asociación Española de Normalización (AENOR). Medicina del laboratorio. Requisitos para los Laboratorios de medida de referencia. UNE-EN ISO 15195. Madrid: AENOR; 2004.
37. RELA – IFCC External quality assessment scheme for reference laboratories in laboratory medicine. (<http://www.dgkl-rfb.de:81/>) (Consulta: 24.09.12)
38. Laboratori de Referència d'Enzimologia Clínica. (<http://sct.uab.cat/lrec/>) (Consulta: 24.09.12)
39. Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM). Evaluation of measurement data – Guide to the expression of uncertainty in measurement. 1st ed. JCGM 100:2008. (<http://www.bipm.org/>) (Consulta: 13.09.12)
40. EURACHEM/CITAC guide. Quantifying uncertainty in analytical measurement, 2nd ed. EURACHEM, 2000. (<http://www.eurachem.org/>) (Consulta: 13.09.12)
41. White GH. Basics of Estimating Measurement Uncertainty. Clin Biochem Rev 2008;29(suppl 1):S53-S60.
42. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Expression of Measurement Uncertainty in Laboratory Medicine; Approved Guideline. CLSI document C51-A. Vol. 32. No. 4. Wayne: CSLI; 2012.
43. Park J, Nam G, Choi J. Parameters in cause and effect diagram for uncertainty evaluation. Accred Qual Assur 2011;16:325-326.
44. Kristiansen J. Description of a generally applicable model for the evaluation of uncertainty of measurement in clinical chemistry. Clin Chem Lab Med 2001;39(10):920-931.
45. Rius F, Barón FJ. Bioestadística. Thomson Parafino, S.A. Madrid; 2005.
46. Joint Research Centre (JRC). Institute for Reference Materials and Measurement (IRMM). Training course: Use of reference materials and the estimation of measurement uncertainty. Course material. Geel, 6 and 7 october 2009.
47. McLaughlin MP. A compendium of common probability distributions. Version 2.3. (http://www.geocities.com/~mikemclaughlin/math_stat/Dists/Compendium.html) (Consulta: 10.10.12)
48. National Institute of Standards and Technology (NIST). The NIST Reference on constants, units and uncertainty. Uncertainty of measurement results. (<http://physics.nist.gov/cuu/Uncertainty/typeb.html>) (Consulta: 09.11.2012)
49. International Organization for Standardization (ISO). Statistics - Vocabulary and symbols - Part 1: General statistical terms and terms used in probability. ISO 3534-1:2006. Geneva: ISO; 2006.

50. Fuentes X, Sánchez J, Cano R, Corral S. Heteroscedasticity and homoscedasticity, and precision profiles in clinical laboratory sciences. *Clin Chim Acta* 2011;412:2351-2352.
51. Fuentes X, González B, Cuadros J. Uncertainty of measurement and heteroscedasticity. *eJIFCC* vol. 14 no. 1. (<http://www.ifcc.org>) (Consulta: 30.08.2012)
52. Bailo C, Casals R, Gomà A, Tudurí J. *Matemàtica COU*. Zona ed. Teide, S.A. Barcelona, 1992.
53. International Organization for Standardization (ISO). Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation. ISO/TS 21748:2004(E).
54. Susan J. *Estadística para biología y ciencias de la salud*. 3ª ed. Mc Graw-Hill Interamericana de España, S.A.U. Madrid; 2001.
55. Stockl D, Dewitte K, Thienpont LM. Validity of linear regression in method comparison studies: is it limited by the statistical model or the quality of the analytical input data? *Clin Chem* 1998;44(11):2340-2346.
56. Solaguren M, Fernández M. On the use of the "uncertainty budget" to detect dominant terms in the evaluation of measurement uncertainty. *Accred Qual Assur* 2011;16:83-88.
57. Bayer WH. *Handbook of tables for probability and statistics*. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, 1968.
58. Guide for volume determination within the scope of reference measurements procedures in medical reference measurements laboratories. Part 1: Calibration liquid water. *PTB-Mitteilungen* 112 2002;2:139-149.
59. Izquierdo S, Gella FJ, Canalias F, Sánchez M, Martínez E. Comisión de Metrología. Recomendaciones para el estudio de la veracidad de los procedimientos de medida en el laboratorio clínico mediante la participación en programas de evaluación externa de la calidad. Documentos de la SEQC 2010,1-11. (<http://www.seqc.es>) (Consulta: 12.11.12)
60. Szasz G, Gruber W, Bernt E. Creatine Kinase in serum: 1. Determination of optimum reaction conditions. *Clin Chem* 1976;22:650-656.
61. Hørder M, Elser RC, Gerhardt W, Mathieu M, Sampson EJ. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 7. IFCC method for creatine kinase. IFCC Recommendation. *Ann Biol Clin* 1990;48:185-202.
62. Infusino I, Panteghini M. Stima dell'incertezza di una misurazione: la riferibilità metrologica ci salverà? *Biochim Clin* 2010;34:245-246.
63. Thompson M. What exactly is uncertainty? *Accred Qual Assur* 2012;17(1):93-94.

64. Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM). Evaluation of measurement data – Supplement 1 to the “Guide to the expression of uncertainty in measurement”- Propagations of distributions using a Monte Carlo method. 1st ed. JCGM 101:2008. (<http://www.bipm.org/>) (Consulta: 14.11.12)
65. Entidad Nacional de Acreditación (ENAC). Guía para la expresión de la incertidumbre en los ensayos cuantitativos. G-ENAC-09. ENAC, 2005. (<http://www.enac.es/>) (Consulta: 14.11.12)
66. National Institute of Standards and Technology (NIST). Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results. NIST Technical Note 1297; 1994. (<http://www.nist.gov/index.html>) (Consulta: 09.11.12)
67. Asociación Española de Normalización (AENOR). Laboratorios clínicos. Requisitos particulares para la calidad y la competencia. UNE-EN ISO 15189. Madrid: AENOR;2007.
68. Kristiansen J. The Guide to expression of uncertainty in measurement approach for estimating uncertainty: an appraisal. Clin Chem 2003;49(11):1822-1829.
69. Magnusson B, Ossowicki H, Rienitz O, Theodorsson E. Routine internal and external quality control data in clinical laboratories for estimating measurement and diagnostic uncertainty using GUM principles. Scand J Clin Lab Invest 2012;72:212-220.
70. Chen H, Zhang L, Bi X, Deng X. Two evaluation budgets for the measurement uncertainty of glucose in clinical chemistry. Korean J Lab Med 2011;31:167-171.
71. Sverresdotter M, Wentzel T, Bolann B. Estimation of minimal preanalytical uncertainty for 15 clinical chemistry serum analytes. Clin Chem 2010;56(8):1329-1335. Guerra E, Ceriotti F.
72. Calcolo dell'incertezza nella determinazione dell'attività catalitica della γ -glutamilttransferasi: confronto fra tre approcci. Biochim Clin 2010;34:259-264.
73. Gesellschaft zur förderung der Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien e.V. (<http://www.instandev.de/>) (Consulta: 14.11.12)
74. Deutsche Vereinte Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V. (<http://www.dgkl.de/>) (Consulta: 14.11.12)
75. Centro Interdipartimentale per la Riferibilità Metrologica in Medicina di Laboratorio. (<http://users.unimi.it/cirme/home/index.php>) (Consulta: 14.11.12)
76. Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine. (<http://www.bipm.org/en/committees/jc/jctlm/>) (Consulta: 14.11.12).

77. Klauke R, Schumann G. Uncertainty sources of reference measurement procedures for enzymes. (<http://users.unimi.it/cirme/home/index.php>) (Consulta: 10.10.12)
78. Frusciante E, Infusino I, Panteghini M. Stima dell'incertezza della misura della concentrazione di attività catalitica dell'alanina amminotransferasi (ALT) nel siero mediante il metodo di riferimento IFCC. *Biochim Clin* 2011;35:20-25.
79. Shaw LM, Strømme JH, London JL, Theodorsen L. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 4. IFCC method for γ -glutamyltransferase. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983;21:633-646.
80. Schumann G, Canalias F, Joergensen PJ, Kang D, Lessinger JM, Klauke R, *et al.* IFCC reference procedures for measurement of catalytic concentrations of enzymes: corrigendum, notes and useful advice. *Clin Chem Lab Med* 2010;48(5):615-621.
81. Gella FJ. *Clinical enzymology*. 2nd ed. BioSystems, S.A. Barcelona, 2005.

ANNEX 1:

PNT-005: PROCEDIMENT DE REFERÈNCIA PRIMARI PER A LA MESURA
DE LA CONCENTRACIÓ CATALÍTICA DE LA GGT

0 ÍNDEX

1	Objectiu de l'examen	3
2	Fonament del mètode	3
3	Instrumental i equip	3
3.1	Especificacions dels equips	3
4	Reactius	4
4.1	Reactius	4
4.2	Preparació de solucions	4
5	Mostres	5
6	Material de referència	5
7	Condicions ambientals	6
8	Procediment	6
9	Resultats	7
10	Referències	8
11	Responsabilitats	9
12	Registres de la qualitat i tècnics	9
13	Annexes	9
	Annex 1. Fitxa de Preparació de Solucions	10
	Annex 2. Registre de Resultats	11

a) Llistat de distribució del document

Copia	Lloc
1	Laboratori

	Nom	Signatura	Data
Elaborat per:	Francesca CANALIAS		22.05.12
Aprovat per:	F. Javier GELLA		22.05.12

b) Control de les modificacions

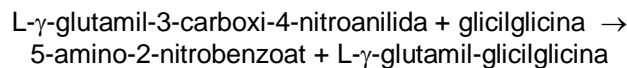
Versió	Modificació
7	<p>Apartat 3 Instrumental i equip: inclusió termòmetre sonda (LREC-017) Apartat 8 Procediment: control temperatura mesura Apartat 9 Resultats: criteri acceptació triplicats, nombre xifres expressió resultats, referència expressió incertesa Apartat 12 Registres de la qualitat i tècnics: afegits codis registres Annex 1 Fitxa preparació solucions: modificació taula control aigua, solució reacció</p>
8	<p>Apartat 3 Instrumental i equip: canvi tipus de cubeta Apartat 4.1 Reactius: nova referència GLUCANA Apartat 4.2 Preparació de solucions: comentari puresa dels reactius Apartat 8 Procediment: canvi programació número de cubetes i temps, interval de mesura i canvi nota. Canvi dels volums de reactius i mostres. Canvi interval de mesura Apartat 9 Resultats: canvi acció en cas de no complir-se valor material referència Annex 1 Fitxa preparació solucions: modificació d'algunes taules</p>
9	<p>Apartat 3 Instrumental i equip: canvi model pHmetre/conductímetre i termòmetre Apartat 4.2 Preparació de solucions: comentari comprovació pH a 37 °C Apartat 9 Procediment: canvi interval de mesura Apartat 10 Referències: canvi referències instruccions equips Annex 1: canvi taula control aigua</p>
10	<p>Apartat 3.1 Especificacions dels equips: desglossat requisit incertesa balança Apartat 4.1 Reactius: canvi GLUPA monohidrat a anhidra Apartat 4.2 Preparació solucions: canvi pes GLUPA Apartat 9 Resultats: afegit correcció volums reactius i mostra segons calibratge pipetes Apartat 10 Referències: afegida nova publicació IFCC</p>
11	<p>Apartat 4.1 Reactius: eliminació referències NaCl i NaOH Apartat 4.2 Preparació de solucions: referència IT-002 preparació solucions ajust pH i BR Apartat 6 Material de referència: indicació us com control qualitat intern Apartat 7 Condicions ambientals: modificació temperatura ambient i interval i registre Apartat 8 Procediment: canvis espectro: lower i upper limits, D2 lamp off; aclariment ordre processament; blanc reactiu: eliminació última frase, addició dos BR, comentari BR negatiu; mostres: modificació n. mesures segons mostra; nou interval mesura Apartat 9 Resultats: restar BR del MR, aclariments processament de resultats Apartat 10 Referències: incloses IT-001 i 002, completada referència CCLM 2010 Apartat 12 Registres de la qualitat i tècnics: afegits RT-001-77 i -002-78, eliminat RT-013-50 Annex 1: eliminació registre solució BR</p>

1 OBJECTIU DE L'EXAMEN

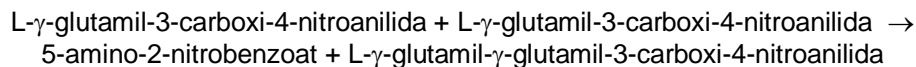
L'objectiu es descriure el procediment per a la mesura de la concentració catalítica de l'enzim γ -glutamilttransferasa ((5-L-glutamil)-pèptid: aminoàcid 5-glutamilttransferasa, GGT, EC 2.3.2.2) en sèrum sanguini d'origen humà i animal seguint el mètode de referència primari descrit per la IFCC.

2 FONAMENT DEL MÈTODE

La concentració catalítica de la γ -glutamilttransferasa és proporcional a la velocitat d'aparició del 5-amino-2-nitrobenzoat mesurat per espectrometria d'absorció molecular a 410 nm. La reacció és la següent:



Al mateix temps es produeix una reacció d'autotransferència que contribueix aproximadament en un 1 % del total:



Concentracions a la barreja final de reacció

N-Glicilglicina	150 mmol/L
pH (37 °C)	7,70 \pm 0,05
L- γ -Glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida	6 mmol/L
Fracció de volum de mostra	0,0909 (1:11)

3 INSTRUMENTAL I EQUIP

- Balança model Handy H51 (Sartorius) (LREC-002).
- Bany d'aigua 2219 Multitemp II (LKB) (LREC-015).
- Cubetes de vidre macro tipus 104-OS de 10 mm (Hellma).
- Espectròmetre model Uvikon 860 (Kontron) (LREC-001).
- Matraus aforats de classe A de volums 20 i 100 mL.
- pHmetre / conductímetre model SevenMulti (Mettler-Toledo) (LREC-020).
- Pipetes automàtiques de 0,200 i 1,000 mL model Pipetman (Gilson).
- Termòmetre de columna de vidre model ASTM (Ludwig Schneider) (LREC-019).
- Termòmetre de sonda model 4500 (Alpha Technics) (LREC-017).

3.1 Especificacions dels equips

Els equips emprats permeten complir les especificacions següents (expressada com a incertesa combinada expandida, $k = 2$, interval de confiança 95 %):

- Balança: pesada ≤ 1 %, puresa del reactiu $\leq 0,5$ %.

- pHmetre: pH \pm 0,05.
- Espectròmetre: ajust longitud d'ona \pm 1 nm, pas de llum \pm 0,01 mm, amplada de banda \leq 2 nm, mesura fotomètrica $<$ 1 %.
- Pipetes: volum reactius i mostra \leq 1 %, volum reconstitució liofilitzat material de referència $<$ 1 %.
- Termòmetre: T \pm 0,1 °C.

4 REACTIUS

4.1 Reactius

- *N*-Glicilglicina, base lliure (contingut glicina $<$ 0,1%) (M = 132,1 g/mol), ref. 1.04233 (Merck) (TA)
- L- γ -Glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida, sal d'amoni (contingut àcid 5-amino-2-nitrobenzoic $<$ 0,1 %) (M = 328,3 g/mol), ref. 10413151 (Roche) (4 °C)

4.2 Preparació de solucions

Les quantitats dels reactius per a la preparació de cada solució estan calculades en funció del percentatge de puresa de cadascun. Si es realitza un canvi de reactiu en el que varïi la seva puresa s'ha de recalculer la quantitat a pesar. L'aigua per a la preparació de les solucions és altament purificada del tipus bidestil·lada, MilliQ o equivalent amb un contingut en silicats $<$ 0,1 mg/L. La seva qualitat es controla mesurant la conductivitat, que ha de ser $<$ 2 μ S/cm; i el pH, que ha d'estar entre 6,0 i 7,0. Els resultats del control de l'aigua s'anoten a la Fitxa de Preparació de Solucions (RT-005-22) (Annex 1).

Solució de reacció

N-Glicilglicina 206,3 mmol/L (2,730 g \pm 0,027 g).

Es dissol en aproximadament 80 mL d'aigua i s'ajusta el pH a 7,70 (37 °C) (segons taula) amb hidròxid de sodi 2 mol/L (el funcionament del pHmetre es descriu al PNT-011 i I-013). Es transfereix tot el volum a un matrau aforat de 100 mL. S'equilibra el matrau i l'aigua a (20 \pm 1) °C i s'arrasa el matrau amb aigua a (20 \pm 1) °C fins la marca de nivell. La solució és estable durant 2 setmanes a 2-8 °C.

NOTA: El pH de la solució de reacció s'ha d'ajustar molt acuradament i comprovar a 37 °C que és de 7,70.

Solució d'inici

L- γ -Glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida 33,0 mmol/L (0,217 g \pm 0,002 g).

Es dissol en aproximadament 15 mL d'aigua i es transfereix a un matrau aforat de 20 mL. S'equilibra el matrau i l'aigua a (20 \pm 1) °C i s'arrasa el matrau amb aigua a (20 \pm 1) °C fins la marca de nivell. La solució és estable durant 1 setmana a 2-8 °C.

Una vegada preparades les solucions es passen a ampolles de plàstic de volum adequat, es retolen amb el nom de la solució, el número de lot, la data de caducitat i el nom del responsable, i es registren a la Fitxa de Preparació de Solucions (RT-005-22) (Annex 1). Les

solucions d'ajust de pH i del blanc de reactiu es preparen segons s'indica a la IT-002 i es registren al Registre de Preparació de Solucions (RT-002-78).

Dependència del pH de la Solució de reacció amb la temperatura

T (°C)	pH	T (°C)	1. pH	T (°C)	pH
20,00	8,139	26,75	7,954	33,50	7,783
20,25	8,132	27,00	7,947	33,75	7,777
20,50	8,125	27,25	7,940	34,00	7,771
20,75	8,118	27,50	7,934	34,25	7,765
21,00	8,111	27,75	7,927	34,50	7,759
21,25	8,104	28,00	7,921	34,75	7,753
21,50	8,097	28,25	7,914	35,00	7,747
21,75	8,090	28,50	7,908	35,25	7,741
22,00	8,083	28,75	7,901	35,50	7,735
22,25	8,076	29,00	7,895	35,75	7,729
22,50	8,069	29,25	7,889	36,00	7,724
22,75	8,062	29,50	7,882	36,25	7,718
23,00	8,055	29,75	7,876	36,50	7,712
23,25	8,048	30,00	7,870	36,75	7,706
23,50	8,041	30,25	7,863	37,00	7,700
23,75	8,034	30,50	7,857	37,25	7,695
24,00	8,027	30,75	7,851	37,50	7,689
24,25	8,021	31,00	7,844	37,75	7,683
24,50	8,014	31,25	7,838	38,00	7,678
24,75	8,007	31,50	7,832	38,25	7,672
25,00	8,000	31,75	7,826	38,50	7,666
25,25	7,993	32,00	7,820	38,75	7,661
25,50	7,987	32,25	7,813	39,00	7,655
25,75	7,980	32,50	7,807	39,25	7,649
26,00	7,973	32,75	7,801	39,50	7,644
26,25	7,967	33,00	7,795	39,75	7,638
26,50	7,960	33,25	7,789	40,00	7,633

5 MOSTRES

Sèrum sanguini d'origen humà o animal, en forma liofilitzada o líquida, conservat a -20 °C. Les mostres liofilitzades es reconstitueixen segons el protocol descrit en el Procediment per a la Manipulació de Mostres d'Assaig (PNT-007). La reconstitució es fa per pesada en el volum indicat d'aigua. El valor de la pesada s'anota al Registre de Resultats (RT-005-23) (Annex 2).

6 MATERIAL DE REFERÈNCIA

Material de referència certificat de γ -glutamyltransferasa, ref. ERM-AD452/IFCC (IRMM) (-20 °C). Valor certificat ($114,1 \pm 2,4$) U/L. Es prepara i conserva segons s'indica al certificat. La reconstitució es fa per pesada en el volum indicat d'aigua. El valor de la pesada s'anota al Registre de Resultats (RT-005-23) (Annex 2). S'utilitza com a control de qualitat intern del procediment de mesura.

7 CONDICIONS AMBIENTALS

Durant l'assaig es comprova que la temperatura ambient del laboratori es manté a $(24,0 \pm 4,0)$ °C.

8 PROCEDIMENT

Les mesures es realitzen en l'espectròmetre Uvikon 860. Les condicions de mesura a programar en el mètode "kinetics" són:

Wavelength	(410 ± 1) nm
Incubation time	60 sec
Reading interval	25 sec
Integration time	1 sec
Number of readings	8
Factor	1382
Blank	0.000 da/min
Lower limit	10
Upper limit	280
Unit / l	U / l
Spectral bandwidth	2.0 nm
Lamp change	340 nm
H lamp	on
D2 lamp	off
Plotter mode	off
Data to RS 232C	off
Cells to measure	1*2*3*4
Blank in cell 1	off

NOTA: En cas de que es vulgui treballar amb menys de quatre cubetes alhora s'ha d'indicar a "cells to measure", i modificar el "reading interval" i el "number of readings" de manera que al multiplicar-los el temps total de la cinètica sigui \geq a 180 s.

L'espectròmetre es tempera prèviament a $(37,0 \pm 0,1)$ °C. Es temperen volums adequats de les solucions de reacció i d'inici a $(37,0 \pm 0,1)$ °C al bany d'aigua (LREC-015), la resta de volums es mantenen a 2-8 °C. Es col·loquen les cubetes de vidre a l'espectròmetre i es pipeteja 2,000 mL de solució de reacció, comprovant amb el termòmetre de sonda (LREC-017) que la temperatura és de $(37,0 \pm 0,1)$ °C. S'afegeixen 0,250 mL de material de referència o mostra, es barreja amb l'ajuda de la pipeta i es deixa incubar durant 180 s. S'afegeixen 0,500 mL de solució d'inici, es barreja amb l'ajuda de la pipeta i es prem "run sample (K1)".

Ordre de processament

Blanc de reactiu, blanc de reactiu del blanc de mostra, blanc de mostra, material de referència i mostres. L'ordre, a partir del blanc de reactiu, es pot modificar en funció de l'estudi.

Blanc de reactiu

Per mesurar-lo, els 0,250 mL de mostra es substitueixen per la solució del blanc de reactiu. L' $\Delta A/\text{min}$ del blanc de reactiu ha de ser inferior a 0,001. En cas contrari, repetir les mesures i, si cal, preparar de nou les solucions de reacció. Es processen dos blancs de reactiu per cada sèrie analítica, un al principi de la sèrie i l'altre al final. Si, a criteri del Tècnic de Laboratori, els dos resultats són molt diferents se'n processa un tercer. Poden obtenir-se valors negatius del blanc de reactiu, en aquests casos és té en compte el valor absolut per fer els càlculs. En cas de sospita que les solucions de reacció estan malmeses o de resultats anòmals de les mostres es repeteix la mesura del blanc de reactiu.

Blanc de mostra

Per mesurar-lo, els 0,500 mL de la solució d'inici es substitueixen per la solució del blanc de reactiu. El blanc de reactiu per el blanc de mostra es prepara substituint la solució de reacció i la mostra per solució del blanc de reactiu. Es processa un blanc de mostra per cada mostra. El resultat del blanc de mostra s'anota però no es té en compte en els càlculs. En cas que la mostra sigui un calibrador, el blanc de mostra ha de ser $< 1\%$ del total de γ -glutamiltransferasa de la mostra.

Mostres

El material de referència es processa per triplicat en cada sèrie analítica. Els materials del programa d'intercomparació (RELA) es mesuren per triplicat en tres dies y en tres vials diferents ($n = 9$). Les mostres, si es tracta de materials als quals s'ha d'assignar valor, es mesuren per triplicat en tres dies y en tres vials diferents ($n = 9$). Altres tipus de mostres, com sèrums, és mesuren per duplicat. Aquesta sistemàtica s'aplica sempre i quan no hi hagin especificacions del client.

Interval de mesura

En cas de que l' $\Delta A/\text{min}$ d'alguna mostra sigui superior a 0,200, aquesta es dilueix $\frac{1}{2}$ en solució del blanc de reactiu i es repeteix la mesura. Si la mostra diluïda segueix donant un $\Delta A/\text{min} > 0,200$, es fa una nova dilució $\frac{1}{2}$ de la mostra diluïda prèviament i es repeteix la mesura. No es fan dilucions superiors a $\frac{1}{4}$, expressant-se el resultat en aquests casos com " $> a$ ". La dilució s'anota al Registre de Resultats (RT-005-23) (Annex 2) i es multiplica el resultat pel corresponent factor de dilució. L'interval de mesura del procediment és de 10 a 280 U/L (0,17 a 4,67 $\mu\text{kat/L}$).

Fonts d'error

Els elevats volums de mostra i de solució d'inici en relació amb el volum de la solució de reacció poden fer que la temperatura de mesura no s'assoleixi en el temps indicat si prèviament no s'ha temperat la mostra i la solució d'inici. La dilució prèvia de la mostra pot donar activitats catalítiques superiors a les esperades.

9 RESULTATS

L'espectròmetre calcula l' $\Delta A/\text{min}$ per regressió lineal de mínims quadrats tenint en compte els n valors d'absorbància mesurats. Els resultats els dona en concentració catalítica i les unitats en U/L ja que al programar la mètrica s'ha inclòs el valor del factor (1.382, calculat considerant que el coeficient d'absorció molar del 5-amino-2-nitrobenzoat a 410 nm = 796 m^2/mol).

Els resultats s'accepten sempre i quan compleixin els següents criteris:

Criteri d'acceptació	Acció en cas de no complir-se
$\Delta A/\text{min}$ del blanc de reactiu < 0,0010	1. Repetir el blanc de reactiu 2. Preparar de nou les solucions d'inici i de reacció
Cinètica lineal durant 180 s (inclou els n punts)	1. Repetir la mesura 2. Diluir la mostra $\frac{1}{2}$ o $\frac{1}{4}$
Valor de la mitja del triplicat del material de referència, restat el blanc de reactiu, dins l'interval (111,7 – 116,5) U/L	1. Repetir el triplicat 2. No continuar l'assaig i consultar al Director de Laboratori
Variabilitat dels triplicats del material de referència i les mostres $\text{CV} \leq 1,50 \%$	1. Repetir el triplicat

Les dades primàries dels blancs i de cada mostra s'anoten al Registre de Resultats (RT-005-23) (Annex 2) tal i com apareixen en pantalla. La mitja dels triplicats i el CV (%) s'anoten al mateix registre a "observacions".

Posteriorment, en processar els resultats (RT-001-77) es tenen en compte les consideracions següents:

- la mitja del valor de concentració catalítica (U/L) obtingut del blanc de reactiu es resta del valor mig de concentració catalítica de cada mostra,
- el valor mig de concentració catalítica de cada mostra es corregeix, una vegada corregit pel blanc de reactiu, per la pesada, en el cas dels liofilitzats,
- el valor mig de concentració catalítica de cada mostra es corregeix, una vegada corregit pel blanc de reactiu i per la pesada en el cas dels liofilitzats, per la fracció del volum de mostra segons els resultats del calibratge de les pipetes,
- el resultat s'expressa amb tres xifres significatives (pe: 345 o 34,5 o 3,45 o 0,345),
- l'arrodoniment en el cas que la darrera xifra sigui un 5 es fa per dalt (pe: 456,5 = 457),
- si s'expressa la concentració catalítica en $\mu\text{kat/L}$ es divideix el resultat, en U/L, per 60,
- la incertesa de mesura associada als resultats es calcula segons s'indica al PNT-016 i s'expressa com s'indica al PNT-015.

10 REFERÈNCIES

- Procediment per al Control dels Equips de Mesura i Assaig (PDG-008).
- Procediment per a la Manipulació de Mostres d'Assaig (PNT-007).
- Procediment per a la Verificació del pHmetre i del Conductímetre (PNT-011).

- Procediment per a la Verificació de Termòmetres i Temperatures (PNT-013).
- Procediment per a l'Elaboració d'Informes d'Assaig (PNT-015).
- Procediment per a la Validació dels Procediments de Mesura i l'Estimació de la Incertesa (PNT-016).
- Instruccions per a la Mesura d'Enzims (IT-001).
- Instruccions per a la Preparació de les Solucions d'ajust del pH i del blanc de reactiu (IT-002).
- Instruccions d'ús de l'espectròmetre Uvikon 860 (I-001).
- Instruccions d'ús de la balança (I-002).
- Instruccions d'ús de les pipetes (I-004).
- Instruccions d'ús del termòmetre de sonda (I-012).
- Instruccions d'ús del pHmetre / conductímetre (I-013).
- Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, *et al.* IFCC Primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C. Part 6. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of γ -glutamyltransferase. Clin Chem Lab Med 2002;40(7):734-8.
- Schumann G, Canalias F, Jørgensen PJ, *et al.* IFCC reference procedures for measurement of the catalytic concentrations of enzymes: Corrigendum, notes and useful advice. Clin Chem Lab Med 2010;48(5):615-21.

11 RESPONSABILITATS

És responsabilitat del Tècnic de Laboratori preparar els reactius i els materials i realitzar les mesures.

És responsabilitat del Director de Laboratori validar els resultats i conservar tots els registres derivats d'aquest procediment.

12 REGISTRES DE LA QUALITAT I TÈCNICS

- Fitxa de Preparació de Solucions (RT-005-22) (Annex 1).
- Registre de Resultats (RT-005-23) (Annex 2).
- Registre de Preparació de Solucions (RT-002-78).
- Full de càlcul de Correcció de Resultats d'Activitat (RT-001-77)
- Fitxa (RT-008-47) i certificat del material de referència.
- Fitxes d'Equips (RT-008-11).
- Documentació subministrada pel client.

El Director de Laboratori arxiva a "l'arxiu controlat (estudis)" (M2-119) els registres de resultats acomplerts. El Tècnic de Laboratori arxiva a "l'arxiu controlat de laboratori" (M2-108) els registres acomplerts de la preparació de solucions.

13 ANNEXES

- Annex 1. Format de Fitxa de Preparació de Solucions.
- Annex 2. Format de Registre de Resultats.

ANNEX 2:

PNT-001: PROCEDIMENT DE REFERÈNCIA PRIMARI PER A LA MESURA
DE LA CONCENTRACIÓ CATALÍTICA DE LA CK

0 ÍNDEX

1	Objectiu de l'examen	3
2	Fonament del mètode	3
3	Instrumental i equip	3
3.1	Especificacions dels equips	4
4	Reactius	4
4.1	Reactius	4
4.2	Preparació de solucions	4
5	Mostres	7
6	Material de referència	7
7	Condicions ambientals	7
8	Procediment	7
9	Resultats	9
10	Referències	10
11	Responsabilitats	11
12	Registres de la qualitat i tècnics	11
13	Annexes	11
	Annex 1. Procediment per a la mesura de la concentració catalítica de glucosa-6-fosfat-deshidrogenasa	12
	Annex 2. Procediment per a la mesura de la concentració catalítica d'hexocinasa	14
	Annex 3. Fitxa de Preparació de Solucions	16
	Annex 4. Registre de resultats	19

c) Llistat de distribució del document

Copia	Lloc
1	Laboratori

	Nom	Signatura	Data
Elaborat per:	Francesca CANALIAS		23.05.12
Aprovat per:	F. Javier GELLA		23.05.12

d) Control de les modificacions

Versió	Modificació
7	<p>Apartat 3 Instrumental i equip: inclusió termòmetre sonda (LREC-017) Apartat 8 Procediment: control temperatura mesura Apartat 9 Resultats: criteri acceptació triplicats, nombre xifres expressió resultats, referència expressió incertesa Apartat 12 Registres de la qualitat i tècnics: afegits codis registres Annex 3 Fitxa preparació solucions: modificació taula control aigua, solucions 1 i 3</p>
8	<p>Apartat 3 Instrumental i equip: canvi tipus de cubeta Apartat 4.1 Reactius: canvi referències AMP i imidazole, inclusió dades puresa Apartat 4.2 Preparació de solucions: comentari puresa dels reactius, canvi quantitats a pesar Apartat 8 Procediment: canvi programació número de cubetes i temps, interval de mesura i canvi nota. Canvi dels volums de reactius i mostres. Canvi interval de mesura Apartat 9 Resultats: canvi acció en cas de no complir-se valor material referència Annex 1 Apartat 1: canvis en la preparació de la solució estoc de glucosa-6-fosfat-deshidrogenasa. Apartat 2: canvis dels volums de reactius i mostres. Annex 2 Apartat 1: canvis en la preparació de la solució estoc d'hexocinasa. Apartat 2: canvis dels volums de reactius i mostres. Annex 3 Fitxa preparació solucions: modificació d'algunes taules</p>
9	<p>Apartat 3 Instrumental i equip: canvi model pHmetre/conductímetre i termòmetre Apartat 4.2 Preparació de solucions: comentari comprovació pH a 37 °C Apartat 8 Procediment: canvi interval mesura Apartat 10 Referències: canvi referències instruccions equips Annex 3: canvi taula control aigua</p>
10	<p>Apartat 3.1 Especificacions dels equips: desglossat requisit incertesa balança Apartat 4.1 Reactius: canvi referència reactiu AMP sal disòdica Apartat 4.2 Preparació de solucions: canvi massa a pesar AMP solució 1 Apartat 5 Mostres: afegit s'han de protegir llum Apartat 6 Material de referència: afegit s'ha de protegir llum Apartat 9 Resultats: afegit correcció volums reactius i mostra segons calibratge pipetes Apartat 10 Referències: afegida nova publicació IFCC</p>
11	<p>Apartat 4.1 Reactius: eliminació referències NaCl, NaOH i àcid acètic Apartat 4.2 Preparació de solucions: referència IT-002 preparació solucions ajust pH i BR Apartat 6 Material de referència: indicació us com control qualitat intern Apartat 7 Condicions ambientals: modificació temperatura ambient i interval i registre Apartat 8 Procediment: canvis espectro: lower i upper limits, D2 lamp off; aclariment ordre processament; blanc reactiu: eliminació última frase, addició dos BR, comentari BR negatius; mostres: modificació n. mesures segons mostra; nou interval mesura Apartat 9 Resultats: restar BR del MR, aclariments processament de resultats Apartat 10 Referències: incloses IT-001 i -002, completada referència CCLM 2010 Apartat 12 Registres de la qualitat i tècnics: afegits RT-001-77 i -002-78, eliminat RT-013-50 Annex 3: eliminació registre solució BR</p>

1 OBJECTIU DE L'EXAMEN

L'objectiu es descriure el procediment per a la mesura de la concentració catalítica de l'enzim creatina-cinasa (ATP: creatina *N*-fosfotransferasa, CK, EC 2.7.3.2) en sèrum sanguini d'origen humà i animal seguint el mètode de referència primari descrit per la IFCC.

2 FONAMENT DEL MÈTODE

La concentració catalítica de la creatina-cinasa és proporcional a la velocitat d'aparició del NADPH mesurat per espectrometria d'absorció molecular a 339 nm. La seqüència de reaccions és la següent:

- (I) fosfat de creatina + ADP → creatina + ATP *creatina-cinasa*
(II) ATP + glucosa → ADP + glucosa-6-fosfat *hexocinasa*
(III) glucosa-6-fosfat + NADP⁺ → gluconat-6-fosfat + NADPH + H⁺ *glucosa-6-fosfat-deshidrogenasa*

Concentracions a la barreja final de reacció

Imidazole	100 mmol/L
pH (37 °C)	6,50 ± 0,05
Fosfat de creatina	30 mmol/L
ADP	2 mmol/L
EDTA	2 mmol/l
Acetat de magnesi	10 mmol/L
<i>N</i> -Acetil-L-cisteïna	20 mmol/L
AMP	5 mmol/L
P ¹ ,P ⁵ -Diadenosina-5'-pentafofat	0,01 mmol/L
D-Glucosa	20 mmol/L
NADP	2 mmol/L
Hexocinasa (37 °C)	66,7 µkat/L
Glucosa-6-fosfat-deshidrogenasa (37 °C)	46,7 µkat/L
Fracció de volum de mostra	0,0435 (1:23)

3 INSTRUMENTAL I EQUIP

- Balança model Handy H51 (Sartorius) (LREC-002).
- Bany d'aigua 2219 Multitemp II (LKB) (LREC-015).
- Cubetes de vidre macro tipus 104-OS de 10 mm (Hellma).
- Espectròmetre model Uvikon 860 (Kontron) (LREC-001).
- Matraus aforats de classe A de volums 10, 50 i 100 mL.
- pHmetre / conductímetre model SevenMulti (Mettler-Toledo) (LREC-020).
- Pipetes automàtiques de 0,020, 0,200 i 1,000 mL model Pipetman (Gilson).
- Termòmetre de columna de vidre model ASTM (Ludwig Schneider) (LREC-019).
- Termòmetre de sonda model 4500 (Alpha Technics) (LREC-017).

3.1 Especificacions dels equips

Els equips emprats permeten complir les especificacions següents (expressada com a incertesa combinada expandida, $k = 2$, interval de confiança 95 %):

- Balança: pesada ≤ 1 %, puresa del reactiu $\leq 0,5$ %.
- pHmetre: pH $\pm 0,05$.
- Espectròmetre: ajust longitud d'ona ± 1 nm, pas de llum $\pm 0,01$ mm, amplada de banda ≤ 2 nm, mesura fotomètrica < 1 %.
- Pipetes: volum reactius i mostra ≤ 1 %, volum reconstitució liofilitzat material de referència < 1 %.
- Termòmetre: T $\pm 0,1$ °C.

4 REACTIUS

4.1 Reactius

- Acetat de magnesi, tetrahidrat (M = 214,5 g/mol, 99,5 %), ref. 1.05819.0250 (Merck) (TA)
- N-Acetil-L-cisteïna (M = 163,2 g/mol, 99 %), ref. A-7250 (Sigma) (4 °C)
- ADP, sal monopotàsica, dihidrat (M = 501,3 g/mol), ref. A-5285 (Sigma), ref. 10233528 (Roche) (4 °C)
- AMP, sal disòdica (M = 391,2 g/mol), ref. 10000094 (Roche-BS) (TA)
- ATP, sal disòdica, trihidrat (M = 605,1 g/mol), ref. 127531 o 127523 (Roche), ref. ATP-03C (Sorachim-BS) (4 °C)
- D-Glucosa, deshidratada (M = 180,2 g/mol), ref. 1.08337.0250 (Merck) (TA)
- β -D-Glucosa-6-fosfat, sal monosòdica (M = 282,1 g/mol, 100 %), ref. G-7879 (Sigma) (TA)
- EDTA, sal disòdica, dihidrat (M = 372,2 g/mol, 99,0-100,1 %), ref. E-4884 (Sigma) (TA)
- Fosfat de creatina, sal disòdica, tetrahidrat (M = 327,2 g/mol), ref. 621722 o 621714 (Roche), ref. CRP-59C (Sorachim-BS) (4 °C)
- Glicerol (M = 92,10 g/mol, 99,5 %), ref. 16374 (USB) (TA)
- Glucosa-6-fosfat-deshidrogenasa (EC 1.1.1.49) de llevat, ref. G6D-321 (Sorachim-BS) (-20 °C)
- Hexocinasa (EC 2.7.1.1) de llevat, ref. 1139 (Genzyme-BS), ref. HXK-311 (Sorachim-BS) (-20 °C)
- Imidazole (M = 68,08 g/mol), ref. 1.04716.1000 (Merck) (TA)
- NADP, sal disòdica (M = 787,4 g/mol), ref. 128058 o 10004669 (Roche) (4 °C)
- P¹,P⁵-Diadenosina-5'-pentafofosfat, sal pentalítica (M = 946 g/mol), ref. D-6392 (Sigma) (-20 °C)

4.2 Preparació de solucions

Les quantitats del reactius per a la preparació de cada solució estan calculades en funció del percentatge de puresa de cadascun. Si es realitza un canvi de reactiu en el que variï la seva puresa s'ha de recalculer la quantitat a pesar. L'aigua per a la preparació de les solucions és altament purificada del tipus bidestil·lada, MilliQ o equivalent amb un contingut en silicats $< 0,1$ mg/L. La seva qualitat es controla mesurant la conductivitat, que ha de ser < 2 μ S/cm; i el pH, que ha d'estar entre 6,0 i 7,0. Els resultats del control de l'aigua s'anoten a la Fitxa de Preparació de Solucions (RT-001-14) (Annex 3).

Solució 1

Imidazole 116,2 mmol/L (0,791 g \pm 0,008 g), acetat de magnesi 14,52 mmol/L (0,313 g \pm 0,003 g), NADP 2,904 mmol/L (0,229 g \pm 0,002 g), glucosa 29,04 mmol/L (0,523 g \pm 0,005 g), ADP 2,904 mmol/L (0,146 g \pm 0,001 g), AMP 7,259 mmol/L (0,284 g \pm 0,003 g) i diadenosina-5'-pentafostat 14,52 μ mol/L (1,36 mg \pm 0,01 mg).

NOTA: Donada la dificultat de pesar la quantitat de diadenosina-5'-pentafostat necessària, es prepara una solució pesant 10 mg i dissolent-los en 2 mL d'aigua. Es pipetegen 0,272 mL de la solució i s'afegeixen a la resta de reactius. En cas de que es pesin quantitats superiors, el volum a pipetejar s'ajusta segons: $V \text{ (mL)} = 1,36 / m_{\text{pesada}} \text{ (mg)}$.

Es dissolen tots els reactius en aproximadament 80 mL d'aigua i s'ajusta el pH a 6,50 (37 °C) (segons taula) amb àcid acètic 1 mol/L (el funcionament del pHmetre es descriu al PNT-011 i I-013). Es transfereix tot el volum a un matrau aforat de 100 mL. S'equilibra el matrau i l'aigua a (20 \pm 1) °C i s'arrasa el matrau amb aigua a (20 \pm 1) °C fins la marca de nivell. La solució és estable durant 2 setmanes a 2-8 °C. Control de la solució: l'absorbància a 339 nm ha de ser inferior a 0,25. En cas contrari preparar de nou la solució.

Dependència del pH de la Solució 1 amb la temperatura

T (°C)	pH	T (°C)	8. pH	T (°C)	pH
20,00	6,822	26,75	6,691	33,50	6,564
20,25	6,817	27,00	6,686	33,75	6,560
20,50	6,812	27,25	6,682	34,00	6,555
20,75	6,807	27,50	6,677	34,25	6,550
21,00	6,802	27,75	6,672	34,50	6,546
21,25	6,797	28,00	6,667	34,75	6,541
21,50	6,792	28,25	6,663	35,00	6,537
21,75	6,788	28,50	6,658	35,25	6,532
22,00	6,783	28,75	6,653	35,50	6,527
22,25	6,778	29,00	6,648	35,75	6,523
22,50	6,773	29,25	6,644	36,00	6,518
22,75	6,768	29,50	6,639	36,25	6,514
23,00	6,763	29,75	6,634	36,50	6,509
23,25	6,758	30,00	6,629	36,75	6,504
23,50	6,754	30,25	6,625	37,00	6,500
23,75	6,749	30,50	6,620	37,25	6,495
24,00	6,744	30,75	6,615	37,50	6,491
24,25	6,739	31,00	6,611	37,75	6,486
24,50	6,734	31,25	6,606	38,00	6,482
24,75	6,729	31,50	6,601	38,25	6,477
25,00	6,725	31,75	6,597	38,50	6,473
25,25	6,720	32,00	6,592	38,75	6,468
25,50	6,715	32,25	6,587	39,00	6,464
25,75	6,710	32,50	6,583	39,25	6,459
26,00	6,705	32,75	6,578	39,50	6,455
26,25	6,701	33,00	6,573	39,75	6,450
26,50	6,696	33,25	6,569	40,00	6,446

NOTA: El pH de la solució 1 s'ha d'ajustar molt acuradament i comprovar posteriorment a 37 °C que és de 6,50.

Solució 2

Hexocinasa 15,490 mkat/L (929,2 kU/L) (37 °C) i glucosa-6-fosfat-deshidrogenasa 10,840 mkat/L (650,4 kU/L) (37 °C) en una solució de glicerol/aigua 50:50 (v/v).

Es prepara una solució de glicerol/aigua 50:50 (v/v) contenint $(10,840 \pm 0,108)$ mkat/L de glucosa-6-fosfat-deshidrogenasa (l'enzim es valora segons el procediment descrit a l'Annex 1). Es prepara una solució de glicerol/aigua 50:50 (v/v) contenint $(15,490 \pm 0,155)$ mkat/L d'hexocinasa (l'enzim es valora segons el procediment descrit a l'Annex 2). Es barregen ambdues solucions volum a volum per obtenir la solució 2. Les solucions són estables 3 mesos a -20 °C.

Solució 3

Imidazole 116,2 mmol/L (0,395 g \pm 0,004 g), EDTA 11,62 mmol/L (0,216 g \pm 0,002 g) i *N*-acetil-L-cisteïna 116,2 mmol/L (0,958 g \pm 0,010 g).

Es dissolen tots els reactius en aproximadament 40 mL d'aigua i s'ajusta el pH a 6,50 (37 °C) (segons taula) amb hidròxid de sodi 1 mol/L. Es transfereix tot el volum a un matrau aforat de 50 mL. S'equilibra el matrau i l'aigua a (20 ± 1) °C i s'arrasa el matrau amb aigua a (20 ± 1) °C fins la marca de nivell. La solució és estable durant 1 setmana a 2-8 °C.

Dependència del pH de la Solució 3 amb la temperatura

T (°C)	pH	T (°C)	9. pH	T (°C)	pH
20,00	6,844	26,75	6,708	33,50	6,571
20,25	6,839	27,00	6,703	33,75	6,566
20,50	6,834	27,25	6,698	34,00	6,561
20,75	6,829	27,50	6,693	34,25	6,556
21,00	6,824	27,75	6,688	34,50	6,551
21,25	6,819	28,00	6,683	34,75	6,546
21,50	6,814	28,25	6,678	35,00	6,541
21,75	6,809	28,50	6,673	35,25	6,536
22,00	6,804	28,75	6,668	35,50	6,531
22,25	6,799	29,00	6,663	35,75	6,526
22,50	6,794	29,25	6,658	36,00	6,520
22,75	6,789	29,50	6,653	36,25	6,515
23,00	6,784	29,75	6,647	36,50	6,510
23,25	6,779	30,00	6,642	36,75	6,505
23,50	6,774	30,25	6,637	37,00	6,500
23,75	6,769	30,50	6,632	37,25	6,495
24,00	6,764	30,75	6,627	37,50	6,490
24,25	6,759	31,00	6,622	37,75	6,485
24,50	6,754	31,25	6,617	38,00	6,480
24,75	6,749	31,50	6,612	38,25	6,475
25,00	6,744	31,75	6,607	38,50	6,469
25,25	6,739	32,00	6,602	38,75	6,464
25,50	6,733	32,25	6,597	39,00	6,459
25,75	6,728	32,50	6,592	39,25	6,454
26,00	6,723	32,75	6,587	39,50	6,449
26,25	6,718	33,00	6,581	39,75	6,444
26,50	6,713	33,25	6,576	40,00	6,439

NOTA: El pH de la solució 3 s'ha d'ajustar molt acuradament i comprovar posteriorment a 37 °C que és de 6,50.

Solució de reacció

Es barregen 20 mL de solució 1, 0,25 mL de solució 2 i 5 mL de solució 3. La solució és estable durant 1 dia a 2-8 °C.

Solució d'inici

Fosfat de creatina 345 mmol/L (1,130 g \pm 0,011 g).

Es dissol en aproximadament 6 mL d'aigua i es transfereix a un matrau aforat de 10 mL. S'equilibra el matrau i l'aigua a (20 \pm 1) °C i s'arrasa el matrau amb aigua a (20 \pm 1) °C fins la marca de nivell. La solució és estable durant 1 mes a 2-8 °C.

Una vegada preparades les solucions es passen a ampolles de plàstic de volum adequat, es retolen amb el nom de la solució, el número de lot, la data de caducitat i el nom del responsable, i es registren a la Fitxa de Preparació de Solucions (RT-001-14) (Annex 3). Les solucions d'ajust de pH i del blanc de reactiu es preparen segons s'indica a la IT-002 i es registren al Registre de Preparació de Solucions (RT-002-78).

5 MOSTRES

Sèrum sanguini d'origen humà o animal, en forma liofilitzada o líquida, conservat a -20 °C. Les mostres liofilitzades es reconstitueixen segons el protocol descrit en el Procediment per a la Manipulació de Mostres d'Assaig (PNT-007). La reconstitució es fa per pesada en el volum indicat d'aigua. El valor de la pesada s'anota al Registre de Resultats (RT-001-15) (Annex 4). Les mostres s'han de protegir de la llum una vegada reconstituïdes.

6 MATERIAL DE REFERÈNCIA

Material de referència certificat de creatina-cinasa isoenzim 2, ref. ERM-AD455/IFCC (IRMM) (-20 °C). Valor certificat (101 \pm 4) U/L. Es prepara i conserva segons s'indica al certificat. La reconstitució es fa per pesada en el volum indicat d'aigua. El valor de la pesada s'anota al Registre de Resultats (RT-001-15) (Annex 4). El material de referència s'ha de protegir de la llum una vegada reconstituït. S'utilitza com a control de qualitat intern del procediment de mesura.

7 CONDICIONS AMBIENTALS

Durant l'assaig es comprova que la temperatura ambient del laboratori es manté a (24,0 \pm 4,0) °C.

8 PROCEDIMENT

Les mesures es realitzen en l'espectròmetre Uvikon 860. Les condicions de mesura a programar en el mètode "kinetics" són:

Wavelength	(339 ± 1) nm
Incubation time	120 sec
Reading interval	25 sec
Integration time	1 sec
Number of readings	6
Factor	3651
Blank	0.000 da/min
Lower limit	30
Upper limit	1270
Unit / l	U / l
Spectral bandwidth	2.0 nm
Lamp change	340 nm
H lamp	off
D2 lamp	on
Plotter mode	off
Data to RS 232C	off
Cells to measure	1*2*3*4
Blank in cell 1	off

NOTA: En cas de que es vulgui treballar amb menys de quatre cubetes alhora s'ha d'indicar a "cells to measure", i modificar el "reading interval" i el "number of readings" de manera que al multiplicar-los el temps total de la cinètica sigui \geq a 120 s.

L'espectròmetre es tempera prèviament a $(37,0 \pm 0,1)$ °C. Es temperen volums adequats de les solucions de reacció i d'inici a $(37,0 \pm 0,1)$ °C al bany d'aigua (LREC-015), la resta de volums es mantenen a 2-8 °C. Es col·loquen les cubetes de vidre a l'espectròmetre i es pipeteja 2,000 mL de solució de reacció, comprovant amb el termòmetre de sonda (LREC-017) que la temperatura és de $(37,0 \pm 0,1)$ °C. S'afegeixen 0,100 mL de material de referència o mostra, es barreja amb l'ajuda de la pipeta i es deixa incubar durant 180 s. S'afegeixen 0,200 mL de solució d'inici, es barreja amb l'ajuda de la pipeta i es prem "run sample (K1)".

Ordre de processament

Blanc de reactiu, blanc de reactiu del blanc de mostra, blanc de mostra, material de referència i mostres. L'ordre, a partir del blanc de reactiu, es pot modificar en funció de l'estudi.

Blanc de reactiu

Per mesurar-lo, els 0,100 mL de mostra es substitueixen per la solució del blanc de reactiu. L' $\Delta A/\text{min}$ del blanc de reactiu ha de ser inferior a 0,0015. En cas contrari, repetir les mesures i, si cal, preparar de nou les solucions de reacció. Es processen dos blancs de reactiu per cada sèrie analítica, un al principi de la sèrie i l'altre al final. Si, a criteri del Tècnic de Laboratori, els dos resultats són molt diferents se'n processa un tercer. Poden obtenir-se valors negatius del blanc de reactiu, en aquests casos és té en compte el valor absolut per fer els càlculs. En cas de sospita que les solucions de reacció estan malmeses o de resultats anòmals de les mostres es repeteix la mesura del blanc de reactiu.

Blanc de mostra

Per mesurar-lo, els 0,200 mL de la solució d'inici es substitueixen per la solució del blanc de reactiu. El blanc de reactiu per el blanc de mostra es prepara substituint la solució de reacció i la mostra per solució del blanc de reactiu. Es processa un blanc de mostra per cada mostra. El resultat del blanc de mostra s'anota però no es té en compte en els càlculs. En cas que la mostra sigui un calibrador, el blanc de mostra ha de ser < 1 % del total de creatina-cinasa de la mostra.

Mostres

El material de referència es processa per triplicat en cada sèrie analítica. Els materials del programa d'intercomparació (RELA) es mesuren per triplicat en tres dies y en tres vials diferents ($n = 9$). Les mostres, si es tracta de materials als quals s'ha d'assignar valor, es mesuren per triplicat en tres dies y en tres vials diferents ($n = 9$). Altres tipus de mostres, com sèrums, és mesuren per duplicat. Aquesta sistemàtica s'aplica sempre i quan no hi hagin especificacions del client.

Interval de mesura

En cas que l' $\Delta A/\text{min}$ d'alguna mostra sigui superior a 0,400, aquesta es dilueix $\frac{1}{2}$ en solució del blanc de reactiu i es repeteix la mesura. Si la mostra diluïda segueix donant un $\Delta A/\text{min} > 0,400$, es fa una nova dilució $\frac{1}{2}$ de la mostra diluïda prèviament i es repeteix la mesura. No es fan dilucions superiors a $\frac{1}{4}$, expressant-se el resultat en aquests casos com " $> a$ ". La dilució s'anota al Registre de Resultats (RT-001-15) (Annex 4) i es multiplica el resultat pel corresponent factor de dilució. L'interval de mesura del procediment és de 30 a 1.270 U/L (0,50 a 21,2 $\mu\text{kat/L}$).

Fonts d'error

La concentració catalítica depèn de la fracció de volum de mostra, i augmenta en cas de dilució de la mostra. Per aquest motiu la dilució de la mostra es limita a $\frac{1}{4}$.

9 RESULTATS

L'espectròmetre calcula l' $\Delta A/\text{min}$ per regressió lineal de mínims quadrats tenint en compte els n valors d'absorbància mesurats. Els resultats els dona en concentració catalítica i les unitats en U/L ja que al programar la mètrica s'ha inclòs el valor del factor (3.651, calculat considerant que el coeficient d'absorció molar del NADPH a 339 nm = 630 m^2/mol).

Els resultats s'accepten sempre i quan compleixin els següents criteris:

Criteri d'acceptació	Acció en cas de no complir-se
$\Delta A/\text{min}$ del blanc de reactiu < 0,0015	1. Repetir el blanc de reactiu 2. Preparar de nou les solucions d'inici i de reacció
Cinètica lineal durant 120 s (ha d'incloure els n punts)	1. Repetir la mesura 2. Diluir la mostra $\frac{1}{2}$ o $\frac{1}{4}$
Valor de la mitja del triplicat del material de referència, restat el blanc de reactiu, dins l'interval (97 - 105) U/L	1. Repetir el triplicat 2. No continuar l'assaig i consultar al Director de Laboratori
Variabilitat dels triplicats del material de referència i de les mostres $\text{CV} \leq 2,00 \%$	1. Repetir el triplicat

Les dades primàries dels blancs i de cada mostra s'anoten al Registre de Resultats (RT-001-15) (Annex 4) tal i com apareixen en pantalla. La mitja dels triplicats i el CV (%) s'anoten al mateix registre a "observacions".

Posteriorment, en processar els resultats (RT-001-77) es tenen en compte les consideracions següents:

- la mitja del valor de concentració catalítica (U/L) obtingut del blanc de reactiu es resta del valor mig de concentració catalítica de cada mostra,
- el valor mig de concentració catalítica de cada mostra es corregeix, una vegada corregit pel blanc de reactiu, per la pesada, en el cas dels liofilitzats,
- el valor mig de concentració catalítica de cada mostra es corregeix, una vegada corregit pel blanc de reactiu i per la pesada en el cas dels liofilitzats, per la fracció del volum de mostra segons els resultats del calibratge de les pipetes,
- el resultat s'expressa amb tres xifres significatives (pe: 345 o 34,5 o 3,45 o 0,345),
- l'arrodoniment en el cas que la darrera xifra sigui un 5 es fa per dalt (pe: 456,5 = 457),
- si s'expressa la concentració catalítica en $\mu\text{kat/L}$ es divideix el resultat, en U/L, per 60,
- la incertesa de mesura associada als resultats es calcula segons s'indica al PNT-016 i s'expressa com s'indica al PNT-015.

10 REFERÈNCIES

- Procediment per al Control dels Equips de Mesura i Assaig (PDG-008).
- Procediment per a la Manipulació de Mostres d'Assaig (PNT-007).
- Procediment per a la Verificació del pHmetre i del Conductímetre (PNT-011).
- Procediment per a la Verificació de Termòmetres i Temperatures (PNT-013).
- Procediment per a la Validació dels Procediments de Mesura i l'Estimació de la Incertesa (PNT-016).
- Procediment per a l'Elaboració d'Informes d'Assaig (PNT-015).
- Instruccions per a la Mesura d'Enzims (IT-001).
- Instruccions per a la Preparació de les Solucions d'ajust del pH i del blanc de reactiu (IT-002).
- Instruccions d'ús de l'espectròmetre Uvikon 860 (I-001).
- Instruccions d'ús de la balança (I-002).
- Instruccions d'ús de les pipetes (I-004).
- Instruccions d'ús del termòmetre de sonda (I-012).
- Instruccions d'ús del pHmetre / conductímetre (I-013).
- Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, *et al.* IFCC Primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C. Part 2. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of creatine kinase. Clin Chem Lab Med 2002;40(6):635-42.
- Schumann G, Canalias F, Jørgensen PJ, *et al.* IFCC reference procedures for measurement of the catalytic concentrations of enzymes: Corrigendum, notes and useful advice. Clin Chem Lab Med 2010;48(5):615-21.

11 RESPONSABILITATS

És responsabilitat del Tècnic de Laboratori preparar els reactius i els materials i realitzar les mesures.

És responsabilitat del Director de Laboratori validar els resultats i conservar tots els registres derivats d'aquest procediment.

12 REGISTRES DE LA QUALITAT I TÈCNICS

- Fitxa de Preparació de Solucions (RT-001-14) (Annex 3).
- Registre de Resultats (RT-001-15) (Annex 4).
- Registre de Preparació de Solucions (RT-002-78).
- Full de càlcul de Correcció de Resultats d'Activitat (RT-001-77).
- Fitxa (RT-008-47) i certificat del material de referència.
- Fitxes d'Equips (RT-008-11).
- Documentació subministrada pel client.

El Director de Laboratori arxiva a "l'arxiu controlat (estudis)" (M2-119) els registres de resultats acomplerts. El Tècnic de Laboratori arxiva a "l'arxiu controlat de laboratori" (M2-108) els registres acomplerts de la preparació de solucions.

13 ANNEXES

- Annex 1. Procediment per a la mesura de la concentració catalítica de glucosa-6-fosfat-deshidrogenasa.
- Annex 2. Procediment per a la mesura de la concentració catalítica d'hexocinasa.
- Annex 3. Format de Fitxa de Preparació de Solucions.
- Annex 4. Format de Registre de Resultats.

ANNEX 1. PROCEDIMENT PER A LA MESURA DE LA CONCENTRACIÓ CATALÍTICA DE GLUCOSA-6-FOSFAT-DESHIDROGENASA**Concentracions a la barreja final de reacció**

Imidazole	100 mmol/L
pH (37 °C)	6,50 ± 0,05
D-Glucosa-6-fosfat	10 mmol/L
ADP	2 mmol/L
EDTA	2 mmol/l
Acetat de magnesi	10 mmol/L
N-Acetil-L-cisteïna	20 mmol/L
AMP	5 mmol/L
P ¹ ,P ⁵ -Diadenosina-5'-pentafofat	0,01 mmol/L
D-Glucosa	20 mmol/L
NADP	2 mmol/L
Fracció de volum de mostra	0,0435 (1:23)

1 PREPARACIÓ DE SOLUCIONSSolució de reacció

Es barregen 10 mL de solució 1, 2,5 mL de solució 3 i 0,125 mL d'aigua. La solució és estable 1 dia a 2-8 °C.

Solució d'inici

β-D-Glucosa-6-fosfat 115 mmol/L (65,00 mg ± 0,65 mg).

Es dissol en 2 mL d'aigua. La solució es prepara el moment d'utilitzar-la.

Solució estoc de glucosa-6-fosfat-deshidrogenasa

Es pesen 25 mg de glucosa-6-fosfat-deshidrogenasa i es dissolen en 1 mL de solució de glicerol/aigua (50:50, v/v). S'afegeixen 0,010 mL d'aquesta solució a 20 mL de solució de glicerol/aigua (50:50, v/v) i s'agita enèrgicament (solució estoc).

NOTA: la dilució és indicativa, dependrà de la concentració inicial de glucosa-6-fosfat-deshidrogenasa.

Una vegada preparades les solucions es registren a la Fitxa de Preparació de Solucions (RT-001-14) (Annex 3).

2 PROCEDIMENT

Les mesures es realitzen en l'espectròmetre Uvikon 860 a (37,0 ± 0,1) °C y les condicions de mesura són les mateixes que les emprades per la creatina-cinasa. Es temperen volums adequats de les solucions de reacció i d'inici a (37,0 ± 0,1) °C al bany d'aigua (LREC-015), la resta de volums es mantenen a 2-8 °C. Es col·loquen les cubetes de vidre a l'espectròmetre i es pipeteja 2,000 mL de solució de reacció, comprovant amb el termòmetre de sonda (LREC-017) que la temperatura és de (37,0 ± 0,1) °C. S'afegeixen 0,100 mL de solució del blanc de reactiu (blanc) o de solució estoc de glucosa-6-fosfat-deshidrogenasa, es barreja amb l'ajuda de la pipeta i es deixa incubar durant 180 s. S'afegeixen 0,200 mL de solució d'inici, es barreja amb l'ajuda de la pipeta i es prem "run sample (K1)".

3 CÀLCULS

Per calcular la concentració catalítica s'ha de restar prèviament a l' $\Delta A/\text{min}$ de cada mostra l' $\Delta A/\text{min}$ del blanc. La concentració catalítica de glucosa-6-fosfat-deshidrogenasa (b) en la solució estoc es calcula:

$$b \text{ (U/L)} = F_{\text{dilució}} \times 3.651 \times \Delta A/\text{min}$$

En cas de que s'hagin fet les dilucions indicades a la preparació de la solució estoc de glucosa-6-fosfat-deshidrogenasa el $F_{\text{dilució}}$ és 2.001. Si es vol expressar en $\mu\text{kat/L}$ cal dividir el resultat, en U/L, per 60.

El resultat obtingut s'anota al registre de la Fitxa de Preparació de Solucions (RT-001-14) (Annex 3).

ANNEX 2. PROCEDIMENT PER A LA MESURA DE LA CONCENTRACIÓ CATALÍTICA D'HEXOCINASA**Concentracions a la barreja final de reacció**

Imidazole	100 mmol/L
pH (37 °C)	6,50 ± 0,05
ATP	10 mmol/L
ADP	2 mmol/L
EDTA	2 mmol/l
Acetat de magnesi	10 mmol/L
N-Acetil-L-cisteïna	20 mmol/L
AMP	5 mmol/L
P ¹ ,P ⁵ -Diadenosina-5'-pentafofat	0,01 mmol/L
D-Glucosa	20 mmol/L
NADP	2 mmol/L
Glucosa-6-fofat-deshidrogenasa (37 °C)	47 µkat/L
Fracció de volum de mostra	0,0435 (1:23)

1 PREPARACIÓ DE SOLUCIONSSolució de reacció

Es barregen 20 mL de solució 1, 5,0 mL de solució 3, 0,125 mL d'aigua i 0,125 mL de la solució de glucosa-6-fofat-deshidrogenasa indicada en la solució 2 de la mesura de creatina-cinasa. La solució és estable 1 dia a 2-8 °C.

Solució d'inici

ATP 115 mmol/L (69,60 mg ± 0,70 mg).

Es dissol en 1 mL d'aigua. La solució es prepara el moment d'utilitzar-la.

Solució estoc d'hexocinasa

Es pesen 25 mg d'hexocinasa i es dissolen en 1 mL de solució de glicerol/aigua (50:50, v/v). S'afegeixen 0,010 mL d'aquesta solució a 20 mL de solució de glicerol/aigua (50:50, v/v) i s'agita enèrgicament (solució estoc).

NOTA: la dilució és indicativa, dependrà de la concentració inicial d'hexocinasa.

Una vegada preparades les solucions es registren a la Fitxa de Preparació de Solucions (RT-001-14) (Annex 3).

2 PROCEDIMENT

Les mesures es realitzen en l'espectròmetre Uvikon 860 a (37,0 ± 0,1) °C y les condicions de mesura són les mateixes que les emprades per la creatina-cinasa. Es temperen volums adequats de les solucions de reacció i d'inici a (37,0 ± 0,1) °C al bany d'aigua (LREC-015), la resta de volums es mantenen a 2-8 °C. Es col·loquen les cubetes de vidre a l'espectròmetre i es pipeteja 2,000 mL de solució de reacció, comprovant amb el termòmetre de sonda (LREC-017) que la temperatura és de (37,0 ± 0,1) °C. S'afegeixen 0,100 mL de solució del blanc de reactiu (blanc) o de solució estoc d'hexocinasa, es barreja amb l'ajuda

de la pipeta i es deixa incubar durant 180 s. S'afegeixen 0,200 mL de solució d'inici, es barreja amb l'ajuda de la pipeta i es prem "run sample (K1)".

3 CÀLCULS

Per calcular la concentració catalítica s'ha de restar prèviament a l' $\Delta A/\text{min}$ de cada mostra l' $\Delta A/\text{min}$ del blanc de reactiu. La concentració catalítica d'hexocinasa (b) en la solució estoc es calcula:

$$b \text{ (U/L)} = F_{\text{dilució}} \times 3.651 \times \Delta A/\text{min}$$

En cas de que s'hagin fet les dilucions indicades a la preparació de la solució estoc d'hexocinasa el $F_{\text{dilució}}$ és 2.001. Si es vol expressar en $\mu\text{kat/L}$ cal dividir el resultat, en U/L, per 60.

El resultat obtingut s'anota al registre de la Fitxa de Preparació de Solucions (RT-001-14) (Annex 3).

