

Castillo, Naomi

“Puesta a punto de la determinación de acetaminofeno parasuero y plasma”

2022

Instituto: Ciencias de la Salud

Carrera: Bioquímica



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución 4.0
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Documento descargado de RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital de la Universidad Nacional Arturo Jauretche

Cita recomendada:

Castillo, N. (2022) *Puesta a punto de la determinación de acetaminofeno parasuero y plasma* [tesis de grado Universidad Nacional Arturo Jauretche]

Disponible en RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital UNAJ <https://biblioteca.unaj.edu.ar/rid-unaj-repositorio-institucional-digital-unaj>

"Puesta a punto de la determinación de acetaminofeno para suero y plasma"

por Naomi Castillo



Directora de Trabajo final: Andrea Villagra

Instituto de Ciencias de la Salud

Carrera: Bioquímica

Fecha de entrega: 17 de marzo, 2022

Resumen

Introducción: El acetaminofeno, o mejor conocido por su nombre comercial “paracetamol”, es un analgésico y antipirético, generalmente usado para tratar la fiebre y dolores corporales moderados. La intoxicación por este fármaco puede causar hepatotoxicidad y, de no tratarse, falla hepática fulminante. Su tratamiento está basado en la administración de N-acetil-cisteína (NAC) en relación a dos factores: el tiempo transcurrido desde la ingesta y la concentración plasmática de paracetamol en ese momento. Por lo tanto, la determinación de acetaminofeno en sangre debe ser tal que se encuentre correctamente puesta a punto y calibrada para asegurar resultados confiables y así poder ofrecer un mejor tratamiento a los pacientes. **Objetivos:** Incorporar una metodología nueva en un autoanalizador de última generación, Verificar la precisión y exactitud del acetaminofeno en el autoanalizador Alinity c-series, verificar la linealidad del acetaminofeno en el autoanalizador Alinity c-series y determinar el desempeño del acetaminofeno en el autoanalizador Alinity c-series

Desarrollo. Método del ensayo: Espectrofotométrico. **Materiales y métodos:** Se usó el protocolo EP 15-A3 para una verificación de precisión y veracidad del método. Además, se usó el protocolo EP 06-A para un ensayo de linealidad. **Conclusiones:** La puesta a punto de la determinación de acetaminofeno en suero y plasma que se realizó para este trabajo final fue exitosa. Se logró incorporar la metodología en el autoanalizador de última generación del laboratorio clínico del Hospital de El Cruce, se pudo crear el ensayo en el autoanalizador y hacer que este lo reconociera, además de que los resultados se transmitían automáticamente al software del laboratorio.

Palabras clave: Puesta a punto, acetaminofeno, intoxicación por paracetamol, EP 15-A3, EP 06-A, verificación de intervalo de referencia, ensayo de linealidad, control de calidad, autoanalizador de última generación, veracidad, precisión

Índice

1. Introducción

2. Importancia del tema

3. Fundamento de la verificación de métodos

- a. EP 15-A3 (Verificación de precisión y veracidad)
- b. EP 06-A (Ensayo de linealidad)

4. Objetivos

- a. Objetivo principal
- b. Objetivos específicos

5. Desarrollo

- a. Método del ensayo
- b. Materiales utilizados para la realización de este trabajo final
- c. Creación del ensayo
- d. Impresión del código de barras/Preparación de reactivos
- e. Controles de calidad
- f. Verificación de la repetibilidad, precisión y veracidad del método/EP 15-A3
- g. Ensayo de linealidad/ EP 06-A

6. Resultados

- a. Controles de calidad
- b. Verificación de la repetibilidad, precisión y veracidad del método/EP 15-A3
- c. Ensayo de linealidad/ EP 06-A

7. Conclusiones

8. Bibliografía

Introducción

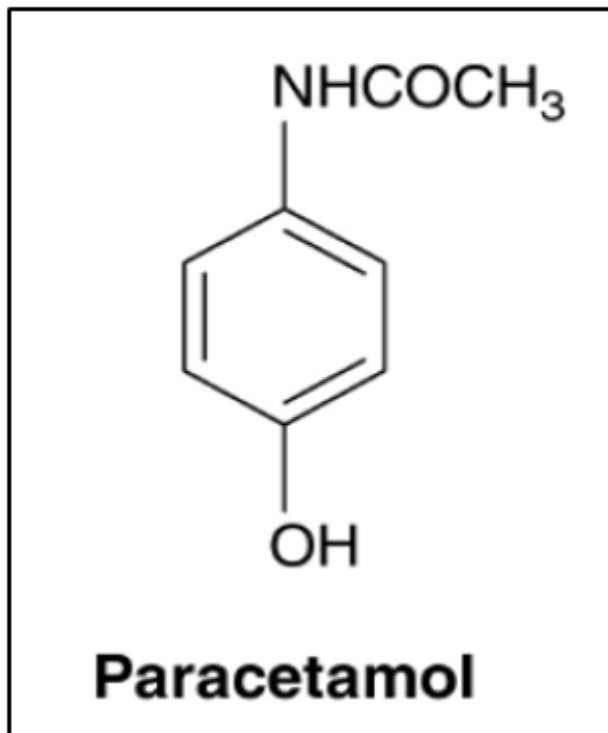


Ilustración 1. Estructura molecular del acetaminofeno (nombre comercial: paracetamol)

El acetaminofeno, o mejor conocido por su nombre comercial “paracetamol”, es un analgésico y antipirético, generalmente usado para tratar la fiebre y dolores corporales moderados. Su acción farmacológica consta de la inhibición de la producción de prostaglandinas y se clasifica como un antiinflamatorio no esteroideo. De los analgésicos de venta libre, es de los más seguros, pues su toxicidad es baja en comparación a otros fármacos tipo AINE que tienen acciones farmacológicas y fisiológicas similares.¹

Sin embargo, la intoxicación por paracetamol, en diversos contextos, se asocia mayormente a falla hepática

aguda, la cual, de empeorar, puede terminar en una insuficiencia hepática fulminante que requiera de un trasplante de hígado. Entre las distintas causas para las intoxicaciones con este fármaco, la más frecuente suele ser la ingestión del mismo con intenciones suicidas o, en caso de infantes y neonatos, errores con la dosificación. Se sabe que el paracetamol es el fármaco no psicoactivo más utilizado en los suicidios e intentos de suicidio.²

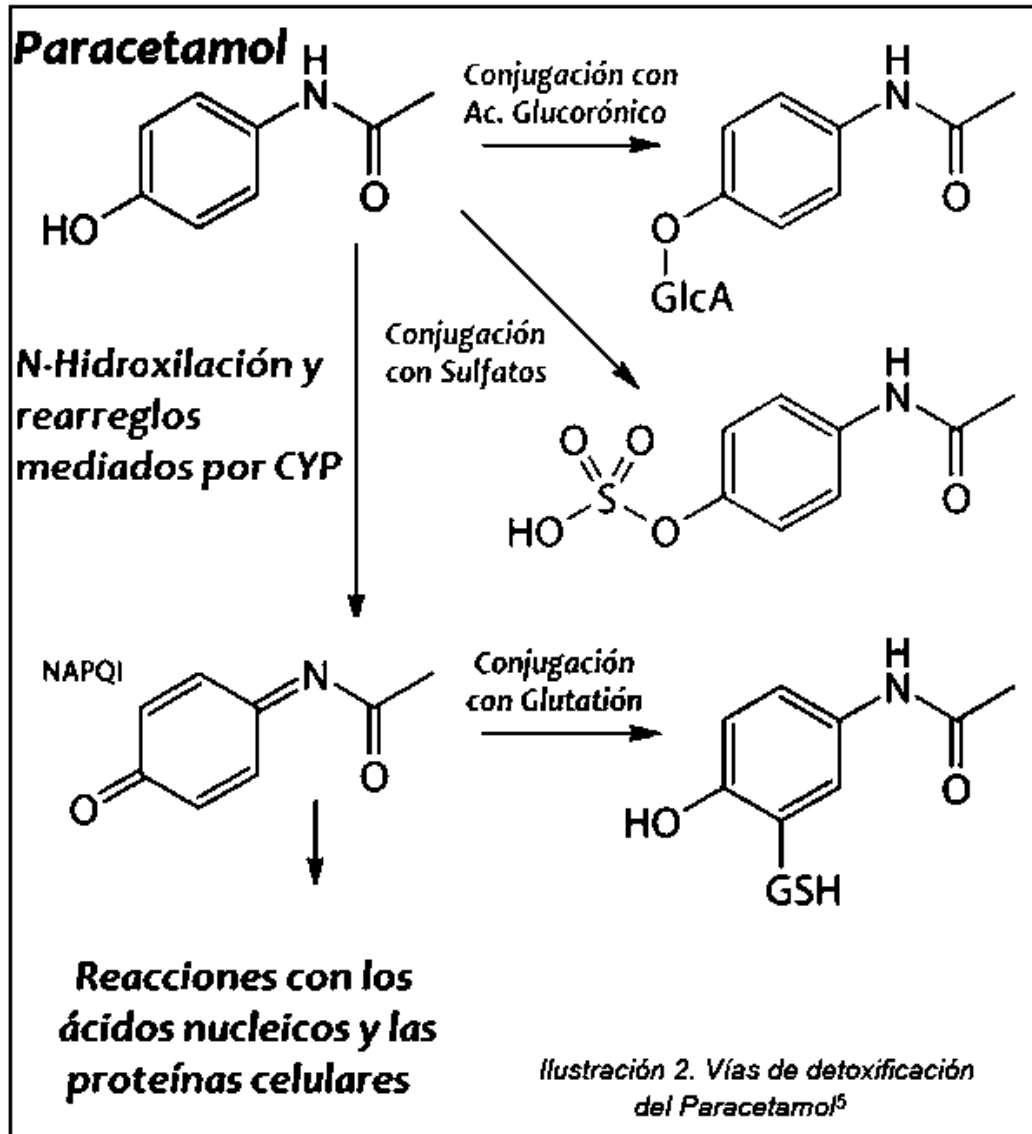
Como se mencionó antes, el hígado es el principal órgano afectado por sobredosis de acetaminofeno debido a su toxicocinética.

A dosis terapéuticas, prácticamente la totalidad del paracetamol es metabolizado por vía hepática (siendo el resto excretado por la orina sin modificación alguna), a través de dos vías:

- Conjugación con sulfatos o ácido glucurónico: esto le ocurre al 90% del fármaco metabolizado en el hígado.
- Oxidación por el citocromo p450: dónde se forma el compuesto tóxico N-acetil-p-benzoquinoneimida (NAPBQ), el cual se conjuga con glutatión para facilitar su detoxificación.³ (Ver vías en la Ilustración 2)

El paracetamol tiene muchas presentaciones y formas de administración, siendo las más comunes:

- En gotas, para pacientes neonatos y pediátricos. La cantidad a utilizar dependerá de la concentración de la solución (en general es de 1 g/ml), pero suele haber una relación de gotas/kg del paciente, cada 4 o 6 horas.



- En píldoras o cápsulas, para pacientes mayores de 10 años y adultos. Si la concentración es de 500 g/píldora, se debe administrar cada 6 horas mientras que, si es de 1 g/píldora, se debe administrar cada 12 horas.⁴

Cuando el paracetamol se ingiere en dosis por encima de las terapéuticas, la vía de la conjugación con sulfatos y con ácido glucurónico se satura y el compuesto se desvía hacia la oxidación por el citocromo p450, aumentando así la producción y eventual acumulación de

NAPBQ. Este compuesto es altamente reactivo, por lo que, si se consumen las reservas hepáticas de glutatión para detoxificarlo, el NAPBQ puede interactuar covalentemente con las proteínas y los ácidos nucleicos de su alrededor, causando la muerte celular de los hepatocitos. Si esta situación no se revierte, el tejido hepático se irá necrosando y, si la cantidad de paracetamol ingerida sobrepasa el límite superior que el hígado sea capaz de detoxificar, puede causar una falla hepática fulminante.⁵

Las siguientes, son las dosis relacionadas con el daño hepático:

| | Adultos y niños > 6 años | Niños < 6 años |
|------------------------------------|---|--|
| Ingestión aguda única | > 150 mg/Kg o 7.5 gr si se ha ingerido en las 8 horas anteriores | >200 mg/Kg si se ha ingerido en las 8 h anteriores |
| Ingestión repetida supratrapéutica | > 200 mg/Kg o 10 gr durante un único periodo de 24 h | >200 mg/ Kg durante un único periodo de 24 h |
| | > 150 mg/Kg o 6 gr durante un periodo de 24 horas en las 48 horas previas | > 150 mg/Kg durante un periodo de 24 horas en las 48 horas previas |
| | > 100 mg/Kg o 4 gr/día en pacientes con factores de riesgo | > 100 mg/Kg durante un periodo de 24 horas en las 72 horas previas |

Tabla 1. Dosis de paracetamol relacionadas a daño hepático ⁶

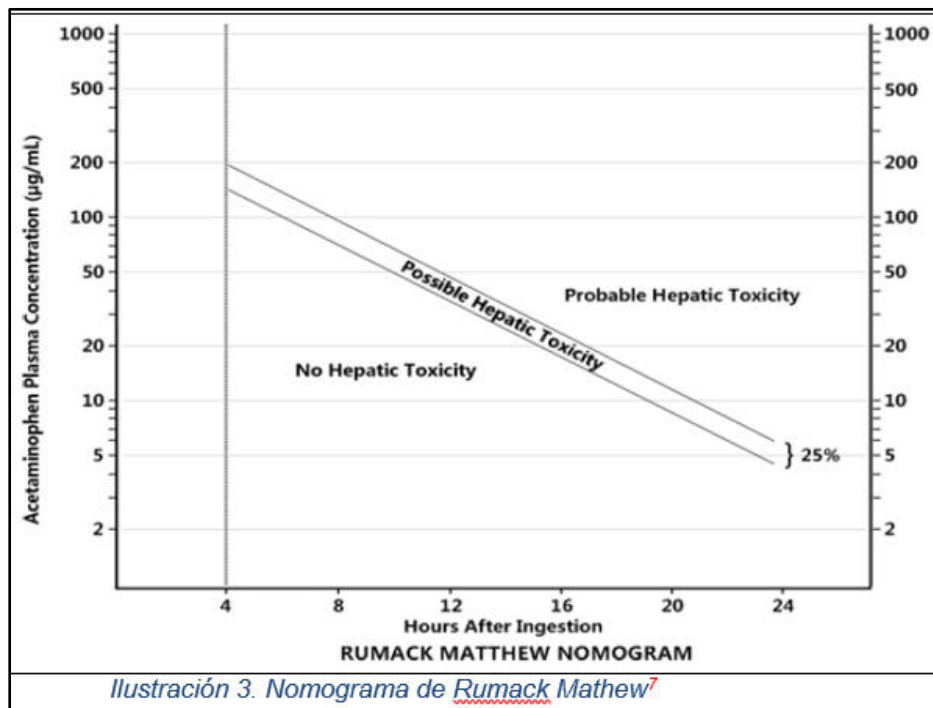


Ilustración 3. Nomograma de Rumack Mathew⁷

Importancia del tema

En las intoxicaciones agudas por acetaminofeno, el tratamiento está basado en la administración de N-acetil-cisteína (NAC) en relación a dos factores: el tiempo transcurrido desde la ingesta y la concentración plasmática de paracetamol en ese momento, de acuerdo al nomograma adaptado de Rumack-Matthew (*ver Ilustración 3*). Por lo tanto, que la determinación clínica de este analito en plasma o suero esté puesta a punto debe ser algo a tener en consideración, ya que el tratamiento que se le brindará al paciente dependerá más que nada de los resultados obtenidos en el laboratorio.

8

| NOMOGRAMA "150" para decidir el uso de la NAC ⁴⁵ | |
|---|--|
| TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA INGESTA | USAR NAC SI LA CONCENTRACION PLASMATICA DE PARACETAMOL ES: |
| 4 horas | > 150 mcg/ml |
| 6 horas | > 100 mcg/ml |
| 8 horas | > 80 mcg/ml |
| 10 horas | > 50 mcg/ml |
| 12 horas | > 30 mcg/ml |
| 14 horas | > 20 mcg/ml |
| 16 horas | > 10 mcg/ml |
| 18 horas | > 7 mcg/ml |
| 20 horas | > 6 mcg/ml |
| 22 horas | > 5 mcg/ml |
| 24 horas | > 4 mcg/mL |

Tabla 2. Relación entre dosis de NAC/tiempo transcurrido desde la ingesta de paracetamol/concentración plasmática de paracetamol

Con respecto a nuestro contexto social, se sabe que, en los últimos años, la mayoría de trasplantes de hígado de pacientes adultos en todo el país fueron realizados en el Hospital El Cruce. Teniendo en cuenta la existencia del Programa de Trasplante Hepático para Adultos en dicho hospital y el hecho de que la intoxicación por paracetamol es una causa bastante común de falla hepática, tener a disposición una determinación para este analito que nos asegure resultados confiables y de calidad, es fundamental para la evaluación de pacientes que potencialmente podrían terminar necesitando un trasplante de hígado.⁹

Además, con esta determinación, podemos estratificar a los pacientes y separar a los que llegan a trasplante hepático debido a la intoxicación por acetaminofeno de los que llegan por otros motivos.

La puesta a punto de la determinación de un analito no sólo nos provee confianza en los resultados que obtenemos en el laboratorio, sino que también nos da la certeza de que, al ser estos resultados veraces, la preocupación por la salud del paciente no está siendo dejada de

lado. Como se mencionó anteriormente, en este caso particular de intoxicaciones con paracetamol, el tratamiento dependerá de un analito determinado en la sangre del paciente. En esa afirmación, por supuesto, está implicado que, si la determinación no está correctamente puesta a punto, corremos el riesgo de informar un valor que podría perjudicar al paciente al recibir un tratamiento que no necesita o carecer del mismo en el caso de necesitarlo. Allí mismo es dónde radica la importancia de, como profesionales de la salud, asegurarnos de que las determinaciones que usamos en el laboratorio estén verificadas por los métodos correctos, para así poder informar resultados de calidad.

Fundamento de la verificación de métodos¹⁰

Los indicadores para evaluar el ensayo estudiado en este trabajo final son los siguientes:

Desvío estándar (SD): medida del grado de dispersión de los datos con respecto al valor promedio. En calidad, nos indica la presencia de errores aleatorios.

$$DS = \sqrt{\sum(x - \bar{x})^2 / N}$$

Coefficiente de variación (CV%): también es una medida de dispersión, pero esta determina la imprecisión del analito y nos indica la presencia de errores aleatorios. Cuanto mayor sea el valor de CV%, mayor heterogeneidad de los valores tendrán la variable.

$$CV = SD / \bar{x}_m * 100$$

Bias o Sesgo (BIAS): es la medida de la diferencia entre el valor asignado como verdadero y aquel que se calcula. Este parámetro indica la exactitud del analito y la presencia de errores sistemáticos. *En este trabajo final, se considera como valor verdadero aquel establecido por el fabricante.*

$$BIAS = \bar{x}_m - \bar{x}_v / \bar{x}_v$$

$$BIAS\% = \bar{x}_m - \bar{x}_v / \bar{x}_v * 100$$

- **EP 15-A3 (Verificación de precisión y veracidad)**

Debido a que muchos laboratorios no pueden permitirse el gasto económico que conlleva realizar la validación de un método, el proceso de verificación de métodos ha resultado algo mucho más accesible, ya que necesita una menor cantidad de tiempo y de recursos para su ejecución. De este modo, cualquier laboratorio puede asegurarse de tener un desempeño analítico similar en sus métodos en comparación a lo establecido por los fabricantes de equipos y reactivos.

Expertos del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) desarrollaron una guía conocida como EP-15, la cual contiene *"diferentes protocolos para verificar las características analíticas de los métodos, y que puede ser aplicado a cualquier laboratorio, independientemente de sus recursos, desde el laboratorio más sofisticado hasta el laboratorio más pequeño"*.¹¹

En esa guía, se describen tres protocolos de verificación: uno de la precisión y dos de la veracidad ("bias o sesgo", usando muestras de pacientes o materiales de referencias con valores asignados). En este trabajo final, se realizó una verificación de la precisión y una de la veracidad empleando materiales de referencia.

- **Verificación de la repetibilidad y la precisión:** Para iniciar con este protocolo, es necesario que los materiales de control a emplear tengan valores cercanos a los niveles de decisión médica y cercanos a aquellos que especifica el fabricante. De ser posible, se debe buscar utilizar los mismos lotes de materiales o matrices de similares características que la de los fabricantes, además de calibrar los equipos que se vayan a usar para los ensayos. Entonces, se deben analizar dos niveles de concentración del material de control, cada uno por triplicado durante 5 días. Con los resultados que se obtienen, se debe evaluar el desvío estándar del laboratorio con respecto al método estudiado utilizando un software con herramientas estadísticas. Un desvío estándar del laboratorio menor al valor de verificación indica que el sistema de medición verifica para precisión. Para hacer la comparación, se deben usar los valores de σ_{WL} (desvío estándar/coeficiente de precisión intermedia) y σ_R (desvío estándar/coeficiente de variación de repetibilidad), que se encuentran en las especificaciones del fabricante.¹²
- **Verificación de la veracidad empleando materiales de referencia:** se requiere que se seleccionen al menos dos materiales que tengan concentraciones

a niveles de decisión altos y bajos en el intervalo detectable del método, y los materiales deben ser preparados de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Luego, se deben analizar dos replicados por día, durante tres a cinco días hasta que se completen diez determinaciones. Entonces, se calcula el intervalo de confianza, y si el valor asignado al material de referencia cae dentro de este intervalo se puede concluir que el método está verificado. ¹³

Evaluación del desempeño del método:¹⁴ Para esto, se evalúan los distintos parámetros que afectan al desempeño analítico de un método clínico, con la finalidad de asegurarse que el mismo cumpla cierto requisito de calidad o se corresponda con aquello establecido por el fabricante. Estos parámetros típicamente incluyen: exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, linealidad, entre otros.

En este trabajo final, se evaluará el desempeño del método utilizando los siguientes parámetros:

- **Error Total (ET):** Es la diferencia porcentual entre el valor medido y el valor aceptado como verdadero. Tiene en cuenta los errores aleatorios y sistemáticos del analito. Este valor refleja la variación total de un resultado con respecto a su valor verdadero. Este valor se compara con el *Error Total Aceptable (ETA)*, que es un valor establecido por diferentes criterios de referencia como: requerimientos médicos, variabilidad biológica, requerimientos regulatorios, especificaciones del fabricante para el método, entre otros.

$$ET\% = 1.65 \cdot CV + \% \text{BIAS} \quad (95\% \text{ probabilidad de acierto})$$

- **Six Sigma (SIGMA):** Es la medida dada por la cantidad de defectos ocurridos en un millón de oportunidades (DPM). En calidad, hace referencia a la cantidad de desvíos estándar que se acomodan dentro de las especificaciones de tolerancia del proceso. Este valor indica qué tan bueno es el desempeño del método.

$$\text{Sigma} = \frac{\%TEa - \% \text{Bias}}{\%CV}$$

- **Error Sistemático Crítico:** Este valor estipula hasta cuándo puede aumentar el sesgo sin superar el ET permitido.

$$ESC = \text{Sigma} - 1,65$$

- **EP 06-A (Ensayo de linealidad)**

Este protocolo se utiliza para la verificación de la linealidad de un intervalo de medición propuesto por el fabricante. En este, la linealidad se evalúa en aspectos estadísticos y clínicos, siendo el último el más importante.

Para esto, se deben preparar cinco soluciones de analito en concentraciones que abarquen el límite inferior y el límite superior del rango de linealidad. A continuación, se deben determinar las concentraciones por triplicado de cada muestra y, con los datos obtenidos, se usan herramientas estadísticas para construir una curva, cuyo gráfico tiene valores teóricos en las abscisas y valores medidos en las ordenadas.

Además, se debe seleccionar un requisito de la calidad para el protocolo, que tenga en cuenta la variabilidad biológica del ensayo y brinde un error total máximo permitido. ¹⁵

Objetivos

El propósito de este trabajo final es poner a punto el ensayo de la determinación cuantitativa de acetaminofeno para suero y plasma humano en el sistema Alinity c-series, para así poder garantizar que la misma brinde resultados fidedignos que se puedan utilizar para el diagnóstico de intoxicación por paracetamol.



Ilustración 4. Autoanalizador Alinity c-series de Abbott, Laboratorio Clínico del Hospital El Cruce

Objetivo principal:

- Incorporar una metodología nueva en un autoanalizador de última generación.

Objetivos específicos:

- Verificar la precisión y exactitud del acetaminofeno en el autoanalizador Alinity c-series
- Verificar la linealidad del acetaminofeno en el autoanalizador Alinity c-series
- Determinar el desempeño del acetaminofeno en el autoanalizador Alinity c-series

Desarrollo

Método del ensayo

El ensayo “Análisis de acetaminofeno L3K” fue desarrollado para la medición cuantitativa IN VITRO de acetaminofeno en suero y en plasma humanos. Este análisis se emplea para el diagnóstico y tratamiento de toxicidad por sobredosis de acetaminofeno.

En este caso, el ensayo se basa en un método espectrofotométrico, cuyo principio se expone a continuación:

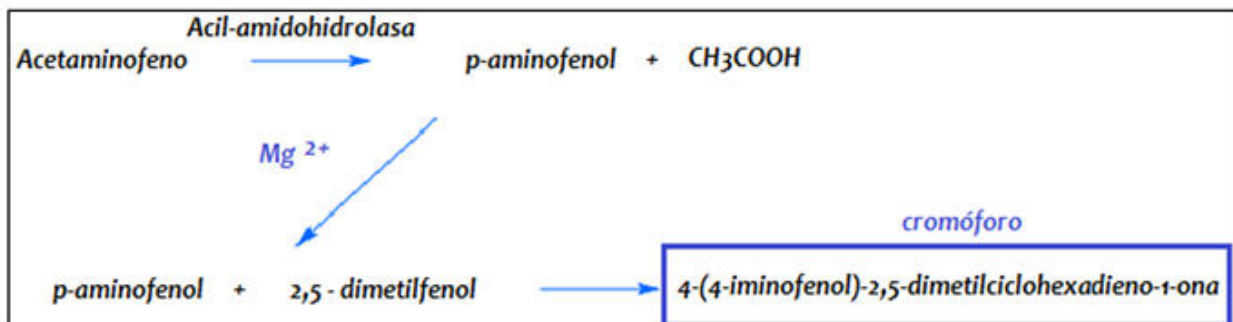


Ilustración 5. Reacciones químicas y principio del análisis, Sekisui Diagnostics¹⁶

La enzima Acil-amidohidrolasa separa el enlace amido de la molécula de acetaminofeno, dejando p-aminofenol y acetato. El p-aminofenol reacciona con 2,5-dimetilfenol en presencia de iones de manganeso para formar un compuesto coloreado, el 4-(4-iminofenol)-2,5-dimetilciclohexadieno-1-ona. El aumento de absorbancia a 605 nm debido a la formación de este último compuesto es directamente proporcional a la concentración de acetaminofeno en la muestra.

Los agentes reactivos son los siguientes: ¹⁷

- **R1:** solución que contiene un tampón (pH 8,6 a 25°C), 0,03 mmol/L de MnCl₂·4H₂O ≥ 0,9 KU/L de la enzima Acil-amidohidrolasa (microbiana), 50 mg/L de azida de sodio

- R2: solución que contiene 0,1 mol/L, de tampón de carbonato de sodio (pH 11,5 a 25°C), 61 mmol/L de 2,5-dimetilfenol, agente estabilizador y agente conservante.

La muestra a utilizar recomendada es suero sin hemolizar, transparente y fresco o plasma heparinizado con litio.

El intervalo de referencia es el siguiente:¹⁸

- Concentración terapéutica: 10-30 µg/ml
- Concentración tóxica: > 200 µg/ml

Materiales utilizados para la realización de este trabajo final

- Autoanalizador (Alinity c-series, Abbott) y sus correspondientes cartuchos de reactivos
- Reactivos (R1 y R2) de acetaminofeno (Sekisui Diagnostics)
- Calibrador (Sekisui Diagnostics)
- Pipetas automáticas y tips correspondientes
- Controles de calidad de acetaminofeno (*Nivel 1, Nivel 2 y Nivel 3*) (Multichem S PlusTechnopath)
- Paracetamol comercial en gotas (Paracetamol Fecofar 0,1 g/ml)
- Agua destilada
- Tubo cónico
- Copas de muestra

Creación del ensayo

Debido a que el ensayo para la determinación de acetaminofeno en suero o plasma no estaba incluido en el autoanalizador Alinity c-series del Hospital de El Cruce, primero se creó en el mismo un ensayo definido por el usuario y se ingresaron los parámetros correspondientes. A su vez, también se

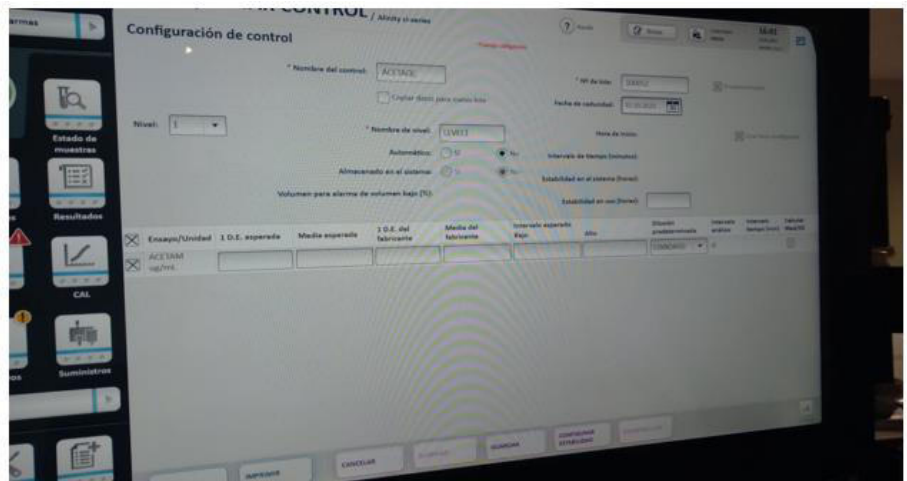


Ilustración 6. Pantalla del autoanalizador Alinity c-series de Abbott, Laboratorio Clínico del Hospital El Cruce

establecieron los parámetros de la calibración. Siguiendo las indicaciones del fabricante.

Los parámetros definidos se muestran a continuación:

| | |
|-----------------------------|--|
| Nombre del ensayo | Modo de reacción: Punto final ascendente |
| ACETAM | Tiempo de lectura principal: 35-37 |
| Nº del ensayo: 2000 | Longitud de onda secundaria: 700 |
| Tipo de ensayo: Fotométrico | Lectura de blanco: 16 - 18 |
| | Última lectura requerida: 37 |

Definición de reacción

| | |
|--------------------------------|-----------------------------------|
| Reactivo/Muestra | Volumen de agua R1: 110 ml |
| <u>Reactivo: ACET2</u> | Volumen de agua R2: 0 ml |
| Volumen de reactivo R1: 80 ml | Dispensación de diluyente: Tipo 1 |
| Volumen de reactivo R2: 160 ml | Modo de dispensación R1: Tipo 1 |
| Nombre diluyente: Saline | Modo de dispensación R2: Tipo 1 |

Se realizó la modificación de las proporciones de R1 y R2 y agua, ya que la metódica que el proveedor remitió era de una versión anterior y no se correspondía con los volúmenes que usa el equipo Alinity c, consultado nuevamente envió la última versión del reactivo dedicado (Reactivo Acetaminofeno Abbott) y tampoco se correspondía a los volúmenes que permitía la configuración del equipo. Recalculando se llegó a la proporción de volumen de reactivo y agua correspondiente.

Dilución predeterminada: STANDARD

| Nombre dilución | Volumen muestra | Volumen de muestra diluida | Volumen diluyente | Volumen de agua | Factor de dilución |
|-----------------|-----------------|----------------------------|-------------------|-----------------|--------------------|
| STANDARD | 10.0 | 0 | 0 | 0 | 1.00 |
| DIL 1 | 20.0 | 10.0 | 180 | 0 | 10.00 |

Tabla 3. Volúmenes de muestra, agua y diluyentes utilizados para el ensayo

Parámetros de la calibración

Nombre del conjunto de calibradores: ACET

Replicados: 3

| Nivel Cal | Concentración | Volumen muestra | Volumen de muestra diluida | Volumen diluyente | Volumen de agua |
|---------------|---------------|-----------------|----------------------------|-------------------|-----------------|
| Blanco: Water | 0.0000 | 10.0 | | | |
| Cal 1: ACET 1 | | 10.0 | | | |

Tabla 4. Volúmenes utilizados para la calibración

Parámetros de resultados

Intervalo linealidad: 0.6000-377.5000

(siguiendo las indicaciones del fabricante)

Unidades de resultados

Unidades: $\mu\text{g/ml}$

Decimales: 4

Factor de correlación: 1.0000

Intersección: 0.0000

Regla de Reanálisis

Nombre regla: Dil 1

Dilución original: STANDARD

Criterio de resultado: Rango resultados

Intervalo: 377.5000

| Ensayo reanálisis | Nº ensayo de reanálisis | Dilución reanálisis | Replicados |
|-------------------|-------------------------|---------------------|------------|
| ACETAM | 2000 | 1/10 | 1 |

Tabla 5. Regla de reanálisis

Esta regla de reanálisis permite que, de forma automática, cuando la concentración de acetaminofeno de la muestra sea mayor a $377,5 \mu\text{g/ml}$, que es el límite superior de linealidad según el fabricante, se diluya para alcanzar la concentración real sin intervención de dilución manual.

Impresión del código de barras/ Preparación de reactivos

Una vez creado el ensayo definido por el usuario, se pasó a la impresión de un informe de códigos de barras de reactivos unidimensionales (1D) para el autoanalizador Alinity c-series. Dicha impresión se realizó en papel autoadhesivo.

Estos códigos de barras, al posicionarlos correctamente sobre los cartuchos de reactivos serán reconocidos por el autoanalizador como aquellos pertenecientes al ensayo ACETAM.



Ilustración 7. Cartuchos de reactivos del autoanalizador Alinity c-series de Abbott con su código de barras correspondiente



Ilustración 8. Agentes reactivos R1 y R2 y otros materiales utilizados

Para este ensayo, se etiquetó un cartucho de reactivos Alinity con el código de barras ACETAM, se rellenaron los cartuchos R1 y R2 con los reactivos correspondientes, debido a que el formato de envase del reactivo original, no permitía colocarlos directamente en el equipo

A continuación, se solicitó a Sistemas que se realizara una conexión entre el autoanalizador y el Software del laboratorio para que cuando el equipo lea código de barras del tubo del paciente, detecte el ensayo creado, lo realice y transmita el resultado en forma automatizada.



Ilustración 9. Colocación del cartucho de reactivos en el autoanalizador

Controles de Calidad



Ilustración 10. Controles de calidad de Nivel 1, Nivel 2 y Nivel 3

reactivo el equipo o la calibración. (Ver gráfica en Resultados)

Durante el período de trabajo, se procesaron controles de calidad (*Nivel 1, Nivel 2 y Nivel 3*) una vez al día con la finalidad de observar el comportamiento del analito en el transcurso de los días de trabajo por medio de una gráfica de Levey-Jennings para evidenciar fallas en el analito ya sea por el

Verificación de la veracidad del método/EP 15-A3

Para corroborar que el método utilizado para la determinación de acetaminofeno cumpliera con las especificaciones del fabricante de precisión y veracidad se realizó el ensayo de EP 15 A3 según la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).



Ilustración 11. Muestras con materiales de referencia para el EP15

Durante cinco días consecutivos, se procesaron cada uno de los 3 niveles de control por quintuplicado.

Luego se cargaron los datos en el software SEM GMONITOR (Consultora Migliarino) para realizar la verificación de la veracidad y la precisión del ensayo ACETAM.

Los datos que se procesaron se muestran a continuación:

Precisión y Veracidad - Nivel 1

- Fecha de evaluación: 01/02/2022
- Equipo: Alinity c / AC 03583
- Procedimiento de Medida: Acetaminofeno
- Unidades: $\mu\text{g/ml}$
- Concentración: 15.8000
- Material: Multichem S Plus
- Tipo: Control Comercial
- Lote: 10002050
- Vencimiento: 31/10/2022
- Lote del Rvo: 58736
- Vencimiento del Reactivo: 30/09/2022
- Lote del Calibrador: 58736
- Vencimiento del Calibrador: 30/09/2022
- σ_R (fabricante): 1.5
- σ_{WL} (fabricante): 2.9
- Días: 5
- N:25

| Corrida | Fecha | Repetición 1 | Repetición 2 | Repetición 3 | Repetición 4 | Repetición 5 |
|-----------|------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Corrida 1 | 24/01/2022 | 17.3307 | 17.3307 | 17.4324 | 17.4042 | 17.3816 |
| Corrida 2 | 25/01/2022 | 17.9578 | 17.9126 | 17.8617 | 17.9126 | 17.9408 |
| Corrida 3 | 26/01/2022 | 18.3532 | 18.3306 | 18.3080 | 18.3306 | 18.3814 |
| Corrida 4 | 27/01/2022 | 16.9071 | 16.8845 | 16.8562 | 16.8562 | 16.8054 |
| Corrida 5 | 28/01/2022 | 17.3081 | 17.2855 | 17.2347 | 17.1556 | 17.2065 |

Tabla 6. Datos para precisión del Nivel 1

Precisión y Veracidad - Nivel 2

- Fecha de evaluación: 01/02/2022
- Equipo: Alinity c / AC 03583
- Procedimiento de Medida: Acetaminofeno
- Unidades: µg/ml
- Concentración: 70.0000
- Material: Multichem S Plus
- Tipo: Control Comercial
- Vencimiento: 31/10/2022
- Lote del Rvo: 58736
- Vencimiento del Reactivo: 30/09/2022
- Lote del Calibrador: 58736
- Vencimiento del Calibrador: 30/09/2022
- σ_R (fabricante): 0.6
- σ_{WL} (fabricante): 1.3
- Días: 5
- N:2

| Corrida | Fecha | Repetición 1 | Repetición 2 | Repetición 3 | Repetición 4 | Repetición 5 |
|-----------|------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Corrida 1 | 24/01/2022 | 69.9839 | 70.1928 | 69.9669 | 69.8144 | 70.0686 |
| Corrida 2 | 25/01/2022 | 70.6956 | 70.2946 | 70.6222 | 70.4697 | 70.6730 |
| Corrida 3 | 26/01/2022 | 70.2720 | 70.1703 | 69.9895 | 70.2437 | 70.0912 |
| Corrida 4 | 27/01/2022 | 68.6168 | 68.6451 | 68.4191 | 68.5434 | 68.4417 |
| Corrida 5 | 28/01/2022 | 69.2721 | 69.4020 | 69.1987 | 69.2778 | 69.1478 |

Tabla 7. Datos para precisión del Nivel 2

Precisión y Veracidad - Nivel 3

- Fecha de evaluación: 01/02/2022
- Equipo: Alinity c / AC 03583
- Procedimiento de Medida: Acetaminofeno
- Unidades: $\mu\text{g/ml}$
- Concentración: 216.0000
- Material: Multichem S Plus
- Tipo: Control Comercial
- Vencimiento: 31/10/2022
- Lote del Rvo: 58736
- Vencimiento del Reactivo: 30/09/2022
- Lote del Calibrador: 58736
- Vencimiento del Calibrador: 30/09/2022
- σ_R (fabricante): 1.3
- σ_{WL} (fabricante): 2.6
- Días: 5
- N:2

| Corrida | Fecha | Repetición 1 | Repetición 2 | Repetición 3 | Repetición 4 | Repetición 5 |
|-----------|------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Corrida 1 | 24/01/2022 | 211.1322 | 210.6747 | 211.9457 | 211.7141 | 211.4090 |
| Corrida 2 | 25/01/2022 | 211.6689 | 211.9739 | 212.5332 | 211.8214 | 212.3016 |
| Corrida 3 | 26/01/2022 | 210.1493 | 209.5110 | 209.1551 | 209.5110 | 209.6409 |
| Corrida 4 | 27/01/2022 | 209.6183 | 209.1664 | 209.5901 | 209.7483 | 209.7257 |
| Corrida 5 | 28/01/2022 | 210.8103 | 210.9402 | 210.7086 | 209.8443 | 210.6351 |

Tabla 8. Datos para precisión del Nivel 3

Nota: Revisando la bibliografía referente a requisitos de la calidad, se eligió el requisito de WSLH (*Wisconsin State Laboratory of Hygiene*), que acepta un 25% de Error Total, un valor con una exigencia intermedia para el desempeño del analito. Además, los datos de σ_R y σ_{WL} provienen del estudio de precisión incluidos en las especificaciones del fabricante.

(Ver Resultado de informe del EP 15-A3 en Resultados)

Ensayo de linealidad/ EP 06-A

Para asegurar que la determinación de acetaminofeno fuera linealmente proporcional a la concentración real del mismo en las muestras, se realizó un ensayo de linealidad, según EP 06-A de CLSI. Se utilizó un requisito de la calidad que tenía un 25% de ET permitido (según WLSH).

Según el fabricante, la concentración terapéutica de acetaminofeno es 10-30 $\mu\text{g/ml}$, la concentración tóxica es mayor a 200 $\mu\text{g/ml}$ y el límite de detección cuantitativa del procedimiento es de 0,6 $\mu\text{g/ml}$ a 377,5 $\mu\text{g/ml}$.¹⁹

Se prepararon cinco soluciones de acetaminofeno con concentraciones que cubrieran el rango de detección cuantitativa previamente mencionado, dónde el mínimo no contuviera nada de acetaminofeno (0%) y el máximo (100%) contuviera al menos un 80% del valor más alto del rango. Para prepararlas, se utilizó una solución de Paracetamol comercial. Las soluciones preparadas por método equidistante, fueron las siguientes:

- 0% (0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de acetaminofeno, sólo agua destilada)
- 25%
- 50%
- 75%
- 100% (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de acetaminofeno)



Ilustración 12. Materiales utilizados para preparar las soluciones de acetaminofeno

La solución de Paracetamol comercial tenía una concentración de 0,1 g/ml (100000 $\mu\text{g}/\text{ml}$). De esta, se tomaron 3 μl y se llevaron a una solución de 1000 μl , obteniendo así una solución de 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de acetaminofeno.

A continuación, se realizaron diluciones equidistantes en cinco copas para cartuchos de reactivos rotuladas 0%, 25%, 50%, 75% y 100%. 0% contenía 1000 μl de agua destilada y 100% contenía 1000 μl de la solución de 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de acetaminofeno. Las otras tres copas inicialmente estaban vacías. Entonces se realizó el siguiente procedimiento:

- Se tomaron 400 μl de la copa 100% y 400 μl de la copa 0%. Ambos se depositaron en la copa 50%. Usando la pipeta automática, se homogeneizó la solución.
- Se tomaron 200 μl de la copa 50% y 200 μl de la copa 0%. Ambos se depositaron en la copa 25%. Usando la pipeta automática, se homogeneizó la solución.

- Se tomaron 200 ml de la copa 50% y 200 ml de la copa 100%. Ambos se depositaron en la copa 75%. Usando la pipeta automática, se homogeneizó la solución.
- Se obtuvieron así cinco soluciones de concentraciones entre 0 $\mu\text{g/ml}$ y 300 $\mu\text{g/ml}$, de 400 μl cada una.

Una vez obtenidas estas soluciones, se determinó la concentración de acetaminofeno en cada una de ellas y se realizó la gráfica correspondiente con el programa estadístico LinCkecker.

(Ver gráfica en Resultados)



Ilustración 13. Soluciones de acetaminofeno con concentraciones de 0%, 25%, 50%, 75% y 100%

Resultados

Controles de Calidad

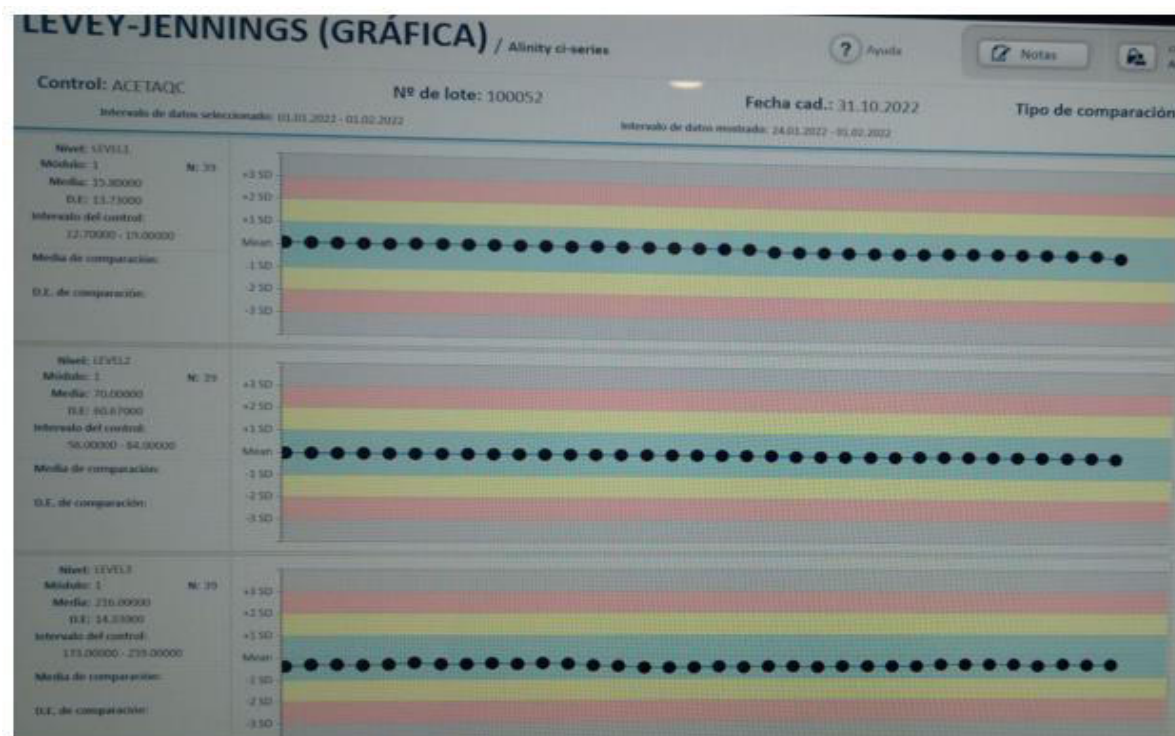


Ilustración 14. Controles de calidad, Gráfica de Levey-Jennings

Durante el período de verificación, se procesaron diariamente los 3 niveles de control y se analizaron por medio de las gráficas de Levey-Jennings proporcionadas por el autoanalizador de última generación utilizado para este trabajo final.

Se observó que todas las determinaciones se mantuvieron en alrededor de la media establecida por el fabricante sin sobrepasar 1DS (+/-) ni mostrar puntos aberrantes en ningún momento. Por lo tanto, se aceptaron todas las corridas realizadas.

Verificación de la repetibilidad, precisión y veracidad del método/EP 15-A3

- *Verificación de la repetibilidad y precisión intermedia*

Para que los criterios de la verificación de repetibilidad y precisión intermedia sean aceptados, se necesita que los coeficientes de variación de repetibilidad (σ_R) y el de precisión intermedia (σ_{WL}) sean menores a los declarados por el fabricante en el inserto del reactivo en cada uno de los niveles ensayados.

Al realizar la verificación, podemos observar lo siguiente para el *Nivel 1*:



Ilustración 15. Informe de precisión - Nivel 1

Para la verificación de repetibilidad, el CV% hallado fue de 0.2. Este valor es menor al σ_R (1,5) establecido por el fabricante, siendo verificada así la especificación de repetibilidad.

Para la precisión intermedia, el CVwl% hallado fue de 3.3. Como este valor es mayor al σ_{WL} (2,9) establecido por el fabricante, en este caso se sugiere utilizar la verificación extendida. Esto se debe a que el fabricante realizó la validación del método con 100 datos (EP 5 CLSI) y en este trabajo final se usaron 25 datos. Al querer comparar estos valores, que no se encuentran en las mismas condiciones, se aplica el UVL σ_{WL} (también llamado Límite Superior de Verificación), valor estimado a partir de los datos de σ_R (fabricante), σ_{WL} (fabricante) y la distribución de χ^2 (chi-cuadrado).

Al aplicar la verificación extendida, el CVwl% (3,3) hallado es menor a la UVL σ_{WL} (4,7) y, por lo tanto, se verifica la precisión intermedia.

Utilizando el mismo razonamiento que para el *Nivel 1*, para el *Nivel 2* y el *Nivel 3* se verificaron tanto la repetibilidad como la precisión intermedia, sin la necesidad de utilizar la verificación extendida.



Ilustración 17. Informe de precisión - Nivel 3



Ilustración 16. Informe de precisión - Nivel 2

- *Verificación de la veracidad*

Tomando los mismos 25 datos utilizados para la verificación de la repetibilidad y la precisión, ahora se evaluó la exactitud (veracidad) del método estudiado. Para esto, se tomó como referencia de valor verdadero la media del inserto del fabricante del control de calidad interno para cada uno de los niveles evaluados y se verificó cada valor teniendo en cuenta los sesgos estadísticos y clínicos. Este último valor fue el limitante para la aceptación de la verificación del ensayo de veracidad.

Para verificar el sesgo estadísticamente, se espera que la media de los datos ensayados se encuentre dentro del rango que se establece a partir de la incertidumbre asociada al valor verdadero (Se_{RM}). En este caso, ese valor es cero, pues se tomó como valor verdadero la media del inserto del control y el error estándar asociado a la media (Se_X).

La verificación del sesgo clínico es el dato más importante porque nos indica cuán alejado está el resultado de la determinación del valor verdadero y cómo este impactaría clínicamente al paciente. En este trabajo final, se toma como referencia el requisito de la calidad elegido y se asigna un presupuesto de error del 50%, denominado Error Sistemático Aceptable (ESA) y tiene que ser mayor al sesgo de la concentración hallada en el ensayo.

En el *Nivel 1*, se puede observar que la media hallada (17,54675) no está contenida en el rango establecido (14,765473-16,834527). Por lo tanto, estadísticamente, la veracidad no es aceptable. Sin embargo, al evaluarlo clínicamente, siendo el ESA de 1,975 $\mu\text{g/ml}$ y el sesgo de 1,7467 $\mu\text{g/ml}$, se observa que el valor del sesgo no supera al valor de ESA. Entonces, la verificación de la veracidad se acepta para el *Nivel 1*, porque el sesgo no afectaría clínicamente al paciente.



Ilustración 18. Informe de veracidad - Nivel 1

En el *Nivel 2*, se puede observar que la media hallada (69,70052) está contenida en el rango establecido (68,576182-71,423818). Entonces, estadísticamente, la veracidad es aceptable. Además, al evaluarlo clínicamente, siendo el ESA de 8,7500 µg/ml y el sesgo de -0,2995 µg/ml, se observa que el valor del sesgo no supera al valor de ESA, por lo que el sesgo tampoco afectaría al paciente clínicamente.



Ilustración 19. Informe de veracidad - Nivel 2

En el *Nivel 3*, se puede observar que la media hallada (210,637117) no está contenida en el rango establecido (214,057338-217,942662). Por lo tanto, estadísticamente, la veracidad no es aceptable. Sin embargo, al evaluarlo clínicamente, siendo el ESA de 27,0000 µg/ml y el sesgo de -5,3628 µg/ml, se observa que el valor del sesgo no supera al valor de ESA. Entonces, la

verificación de la veracidad se acepta para el *Nivel 3*, porque el sesgo no afectaría clínicamente al paciente.



Ilustración 20. Informe de veracidad - Nivel 3

- *Evaluación del desempeño*

| Nivel de Decisión Médica | Concentración | Unidades | % ETa | % CV _{WL} | % Sesgo | % ET | Sigma | ESc | % EAa | % ESa |
|--------------------------|---------------|----------|-------|--------------------|---------|------|-------|------|-------|-------|
| 1 | 15.8000 | ug/mL | 25.0 | 3.3 ☉ | 11.1 ☉ | 17.7 | 4.2 | 2.5 | 6.3 | 12.5 |
| 2 | 70.0000 | ug/mL | 25.0 | 1.2 ☉ | 0.4 ☉ | 2.8 | 21.1 | 19.5 | 6.3 | 12.5 |
| 3 | 216.0000 | ug/mL | 25.0 | 0.5 ☉ | 2.5 ☉ | 3.6 | 41.3 | 39.7 | 6.3 | 12.5 |

Ilustración 21. Informe de desempeño del método

Con los datos de precisión intermedia (CV_{wl}%) y de Sesgo % previamente obtenidos se calcula el Error Total. Luego, con el valor de ET, se calcula el Sigma.

El Error Sistemático Crítico es el valor utilizado para identificar la regla que se va a utilizar en la gráfica de Levey-Jennings y, de esa manera, detectar los Errores Aleatorios y Sistemáticos Aceptables.

Como puede observarse el desempeño es bueno, ya que el Sigma del *Nivel 1* es igual a 4 y se toma este valor por ser el limitante entre los 3 niveles.

Ensayo de linealidad/ EP 06-A

El ensayo de linealidad verifica el rango de medición del equipo para el analito, el acetaminofeno en este caso, por medio de la realización de diluciones equidistantes de 5 concentraciones realizadas por triplicado. (Ver Tabla 9)

| Dil. | Assigned | Replic 1 | Replic 2 | Replic 3 |
|------|----------|----------|----------|----------|
| 1 | 0 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 2 | 134.69 | 145.6490 | 144.7600 | 145.9321 |
| 3 | 269.381 | 297.9004 | 298.2571 | 298.9196 |
| 4 | 404.071 | 407.6949 | 412.2815 | 409.7334 |
| 5 | 538.761 | 543.5366 | 537.6477 | 535.0996 |

Tabla 9. Datos ingresados en el programa LinCkecker

De forma ideal, se espera que el rango de medición sea lineal, pero muchas veces, debido a factores como la variabilidad biológica, no lo es. Debido a esto, se evalúa la ecuación de la curva obtenida a partir de las determinaciones del analito en las diluciones equidistantes, para definir si el error de no linealidad es significativo para el ensayo. Además, se observa que el error de no linealidad ocurre en dónde se hace el punto inflexión en la curva y se busca que este no supere el presupuesto de error del 50% del requisito de la calidad, que en este caso es el ESA. Se obtuvo la siguiente curva (ver Ilustración 22):

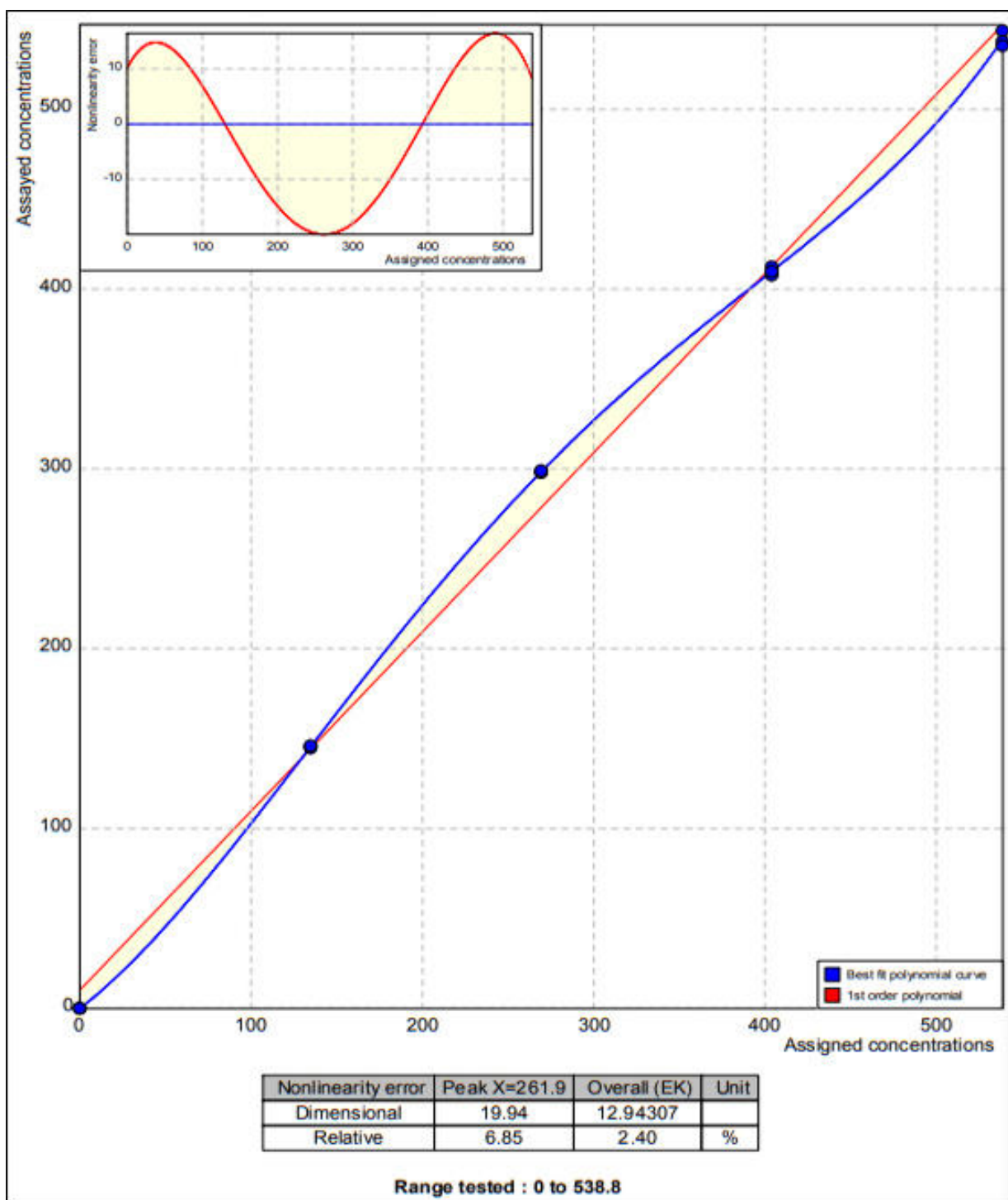


Ilustración 22. Curva polinómica extraída del programa LinCkecker

Se obtuvo una gráfica en dónde el eje de las abscisas corresponde a las concentraciones asignadas (teóricas) y el eje de las ordenadas corresponde a las concentraciones medidas.

Como puede observarse, la curva no es lineal.

Para analizarlo estadísticamente, el programa utilizado (**LinCkecker**) trazó la curva que mejor ajusta todos los puntos obtenidos y es la que se ve como una línea de color azul, mientras que la línea roja representa a la recta de referencia. Esta resultó ser una curva de orden 4, cuya ecuación polinómica se muestra a continuación (ver *Tabla 10*):

| Graph | | Nonlinearity | | Polynomials | | | |
|--|------------|--------------|--------|-------------|--------------|----------------|--|
| Best fit polynomial regression : $y = -1.324E-6 + 0.7317 x + 0.004268 x^2 - 1.433E-5 x^3 + 1.361E-8 x^4$ | | | | | | | |
| Coefficient | Value | SE | t-test | Probability | Significance | SE of regress. | |
| Order 1 | | | | | | | |
| b_0 | 10.1 | 5.21 | 1.938 | 0.075 | NS | | |
| b_1 | 0.9963 | 0.01579 | 63.089 | 0.000 | S | 11.65 | |
| Order 2 | | | | | | | |
| b_0 | -0.551 | 3.757 | -0.147 | 0.886 | NS | | |
| b_1 | 1.154 | 0.03304 | 34.937 | 0.000 | S | | |
| b_2 | -0.0002935 | 5.882E-5 | -4.990 | 0.000 | S | 6.915 | |
| Order 3 | | | | | | | |
| b_0 | -1.536 | 4.034 | -0.381 | 0.711 | NS | | |
| b_1 | 1.207 | 0.07618 | 15.842 | 0.000 | S | | |
| b_2 | -0.000565 | 0.0003591 | -1.573 | 0.144 | NS | | |
| b_3 | 3.359E-7 | 4.382E-7 | 0.767 | 0.459 | NS | 7.037 | |
| Order 4 | | | | | | | |
| b_0 | -1.324E-6 | 1.282 | 0.000 | 1.000 | NS | | |
| b_1 | 0.7317 | 0.05314 | 13.769 | 0.000 | S | | |
| b_2 | 0.004268 | 0.0004952 | 8.618 | 0.000 | S | | |
| b_3 | -1.433E-5 | 1.47E-6 | -9.752 | 0.000 | S | | |
| b_4 | 1.361E-8 | 1.358E-9 | | 0.000 | S | 2.22 | |

Tabla 10. Tabla extraída del programa LinCkecker

En referencia a la ordenada al origen con el orden de la ecuación, podemos observar que a pesar de no ser lineal la curva, el *error de no linealidad* no es significativo.

Al observar el pico de inflexión en donde se produce el error de no linealidad, el porcentaje relativo es de 6,85% siendo el ESa de 12.5%. Con esto, el rango reportable es de 0 a 538,7613, tal como figura en la *Tabla 9*. Por lo tanto, el rango declarado por el fabricante (0,6 µg/ml a 377,5 µg/ml) ha sido verificado y se ha probado que la dilución automática cuando se supera el valor superior ha sido programada correctamente.

Conclusiones

El proceso de puesta a punto de una determinación en el laboratorio clínico es esencial para garantizar resultados confiables, aptos para la toma de decisiones médicas. De este modo, se mejora la calidad de los análisis clínicos, lo que también mejora la atención al paciente en el sector de la Salud.

Como se había mencionado al comienzo de este trabajo final, cuando ocurre una intoxicación por paracetamol, el tratamiento que se le brinde al paciente depende de la concentración de analito que se determine en su sangre. Por lo tanto, es de vital importancia asegurarse que la determinación funcione de la mejor forma posible para que los valores informados no corran el riesgo de perjudicar a un paciente.

La puesta a punto de la determinación de acetaminofeno en suero y plasma que se realizó para este trabajo final fue exitosa. Se logró incorporar la metódica en el autoanalizador de última generación del laboratorio clínico del Hospital de El Cruce, se pudo crear el ensayo en el autoanalizador y hacer que este lo reconociera, además de que los resultados se transmitían automáticamente al software del laboratorio.

Con respecto a la verificación de la precisión del método, en los tres niveles que se evaluaron, se verificaron las especificaciones del fabricante, tanto para la repetibilidad como para la precisión intermedia. Sólo en el *Nivel 1*, se tuvo que aplicar la verificación de la precisión intermedia extendida (UVL σ_{WL} o Límite Superior de Verificación), en lugar de aquel que proveía el fabricante para validar los resultados.

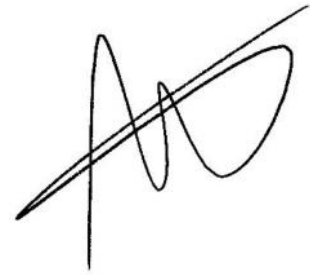
Con respecto a la verificación de la veracidad del método, en todos los casos, los sesgos fueron clínicamente aceptables, a pesar de que en los *Niveles 1 y 3* tenían sesgos estadísticamente no aceptables.

En cuanto al desempeño del método, se obtuvieron Errores totales de 17,7% para el *Nivel 1*, 2,8% para el *Nivel 2* y 3,6% para el *Nivel 3*. Como el Error total permitido según el requisito de la calidad WLSH era 25%, se concluye que el método queda verificado.

En relación a los controles de calidad, no se observaron medidas aberrantes ni fallas en las reglas, en ninguno de los días que se hicieron durante el período de trabajado, como se observó en la Ilustración 14, lo cual indica que el ensayo se encontraba bien calibrado y estaba funcionando correctamente luego de haber sido creado en el autoanalizador de última generación.

Con respecto a la linealidad clínica del ensayo, se obtuvo un pico máximo de no linealidad de 6,85%. Como este valor no supera el Error Total permitido, se considera que la linealidad en el rango propuesto por el fabricante (0,6 µg/ml a 377,5 µg/ml) queda verificada.

En conclusión, el método para la determinación de acetaminofeno con el que se trabajó fue verificado correctamente y cumple con todos los requisitos de la calidad que fueron establecidos en este trabajo final. Finalmente, se puede decir que el ensayo ACETAM, creado en el autoanalizador de última generación que se encuentra en el laboratorio clínico del Hospital El Cruce, arrojaría resultados verificados y confiables, aptos para la toma de decisiones médicas.



Firma:

Aclaración: Naomi Castillo

DNI: 39387805

Bibliografía

- ¹ Rang y Dale (2016). *Farmacología*. Ed. Elsevier Churchill Livingstone
- ² Villanueva Cañadas, E. (2004). 65. *Intoxicaciones por medicamentos*, J.A. Gisbert Calabuig y M.S. Gisbert Grifo, Medicina legal y toxicología (Sexta edición), Ed. Elsevier Masson
- ⁴ Prospecto, *Paracetamol Gotas*, Fecofar
<https://drive.google.com/file/d/1ioGD9YgaRUjPOSAIKNHD7uD7tV1iWiCX/view>
- ⁵ Henry, John (1995). “*Poisoning*”. Marshall, William Leonard. Clinical biochemistry: metabolic and clinical aspects
- ^{3, 6, 7, 8} Hospital General Universitario de Alicante. (2009). *Intoxicación por paracetamol*
<https://www.enfermeriaaps.com/portal/biblioteca>
- ⁹ Rojas, P. Marogna, N. Villamil, F. (2017). *Impacto de un Programa Público de Alto volumen en el Acceso al Trasplante Hepático de Adultos en Argentina sin Cobertura Social*
<https://repositorio.hospitalelcruce.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/572/1.%20Federico%20Villamil.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- ^{10, 14} Villagra, Andrea. *Como trabajar en calidad y no morir en el intento*.
- ^{11, 12, 13} Brambila Eduardo, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México, “*Validación y Verificación de Sistemas de Medición en el Laboratorio Clínico*”
<https://www.ifcc.org/media/216093/Validacion.pdf>
- ¹⁵ Gimenez J; Giorgini MF; Mladin J; Ligorria S, “*Verificación del intervalo de medición de un método diazo para dosar bilirrubina sérica en un hospital público polivalente de la provincia de Córdoba*”
<https://cobico.com.ar/wp-content/archivos/2019/11/intervalo.pdf>
- ^{16, 17, 18, 19} Sekisui Diagnostics, Inserto, “*Análisis de Acetaminofeno L3K*”
<https://sekisuidiagnostics.com/wp-content/uploads/2020/05/Acetaminophen-Insert-IN50610-all-languages.pdf>