# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

## FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

***"ANÁLISIS DE LAS CONDICIONES MÍNIMAS DE LAS VALIDACIONES PARCIALES DE ANALITOS DE PRUEBA DE GLUCOSA UTILIZADAS EN LAS PRUEBAS QUE SE REALIZAN EN EL LABORATORIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS DE LA FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGIA"***

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**"QUÍMICO FARMACOBIÓLOGO"**

PRESENTA:
**BRUNO INEIRA. RIOS**

ASESOR :
**MAESTRO EN CIENCIAS FISICAS GABINO ESTEVEZ DELGADO**

CO-ASESORA:
**MAESTRA EN CIENCIAS DE LA EDUCACION MARÍA REBECA TINOCO MARTÍNEZ**

**Diciembre de 2013**

## *DEDICATORIA*

*Con todo mi amor y cariño, siempre estaré agradecido de todo corazón, por todo. Este trabajo representa el esfuerzo incansable de dos personas que para mí son las más importantes en este mundo, gracias por el apoyo incondicional y por todo. Las palabras me quedan cortas para expresar lo mucho que los quiero, que los amo y los admiro.*

*Este trabajo de investigación se lo dedico a:*

*Mi padre:*

*David Ineira Castro*

*Y a mi madre:*

*Virgilia Ríos Torres*

## AGRADECIMIENTOS


- *A Dios, que nos permite la maravillosa experiencia de vivir, de poder sentir y poder realizar grandes logros en esta vida.*
- *A mis padres, David Ineira Castro y Virgilia Rios Torres, por su esfuerzo, por sus consejos, por su apoyo incondicional, muchas gracias!*
- *A mis hermanos Norma Ina, Francisca, J. Jesús, Jiliano, Rober, Eveydi y Laura, gracias por todo el apoyo brindado, quiero expresar mi mayor gratitud a J. Jesus, porque considero que su apoyo fue mayor durante todo el transcurso de mi carrera.*
- *Al Laboratorio de Análisis Clínico de la Facultad de QFB, a todo su personal, compañeros del laboratorio, a las Químicas que laboran en el mismo, puntualmente quiero agradecer a QFB. Judith Ayala García, por su aceptación como ayudante del laboratorio. Gracias!*
- *A mi asesor de tesis, M.C Gabino Estévez Delgado, gracias por todo el apoyo incondicional brindado.*
- *A mi co-asesor M.C María Rebeca Tinoco Martínez, por su tiempo brindado.*
- *A la QFB Yazmín Cuevas Muñoz, por la ayuda brindada en el proceso de la validación.*
- *A mis compañeros de tesis América Lisbeth, Dulce Ivette y Luis Angel, el proceso fue pesado, pero todo se puede!*
- *A los revisores de esta tesis, Ing. Jorge Pavel Tafoya, QFB Osar Castro Hernández y Dr. Raúl Cortés Martínez.*
- *A la coordinación de proyectos de investigación de la UMSNH por el apoyo económico proporcionado.*
- *A todos los que de manera directa o indirecta formaron parte de este proyecto de investigación.*

## ABREVIATURAS

**a.a:-** aminoácido

**ADP:-** Adenosin Difosfato

**AFNOR** :- Asociación Francesa de Normalización

**ATP**:- Trifosfato de Adenosina

**BIPM**:- Buró Internacional de Pesas y Medidas

**CEIMA**:- Calificaciones de Equipos e Instrumentos de Medición Analítica

**CENAM**.- Centro Nacional de Metrología

**CGPM**:- Conferencia General de Pesas y Medidas

**CIPM**:- Comité Internacional de Pesas y Medidas

**CV**.- Coeficiente de variación

**DIN**:- Normas de la Industria Alemana

**DM**:- Diabetes Mellitus

**ema.-** Entidad Mexicana de Acreditación

**EURACHEM**. – Foro Europeo para discutir control de calidad en Química Analítica

**GUM**.- Guía para la expresión de incertidumbre de medida

**IEC**:- Comisión Internacional de Electrónica

**ISA**:- Associations Internacional Standardization

**ISO**.- Organización Internacional de Normalización

**IUPAC**.- Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

**LAC-QFB:** laboratorio de Quimico Farmacobiología

**LDH**:- Lactato Deshidrogenasa

**LoD.-** Límite de detección

**LoQ**.- Límite de cuantificación

**MR**.- Material de Referencia

**MRC**.- Material de Referencia Certificado

**NAD:** Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina

**NADH**: Nicotidamina Adenina Dinucleótido reducido

**NADI**: Normen-Ausschuss der Deutschen Industrie

**OAA.-** Organismo de Acreditación Argentino

**OMS**: Organización Mundial de la Salud

**PDH**: Fosfato Deshidrogenasa

**QFB**: Químico Farmacobiología

**SD.-** Desviación estándar

**UMSNH**: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

# ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 EVOLUCIÓN HISTÓRICA DE LAS NORMAS ..... 12
Tabla 2. REALIZACIÓN DE LAS DILUCIONES ..... 43
Tabla 3. DATOS DE LAS MEDICIONES DE LAS DILUCIONES ..... 44
Tabla 4. PARA EL GRÁFICO DE LA LINEALIDAD ..... 45
Tabla 5. PORCENTAJE DE ERROR ..... 46
Tabla 6. MEDICIONES DE LAS 24 HORAS ..... 47
Tabla 7. PROMEDIO, DESVIACIÓN ESTANDAR Y COEFICIENTE DE VARIACIÓN ..... 48
Tabla 8. MEDIAS DE LOS BLANCOS ..... 52

# ÍNDICE DE IMÁGENES Y FIGURAS

Ilustración 1. LA GLUCOSA ..... 25
Ilustración 2. ESTRUCTURA DEL GLUCÓGENO ..... 26
Ilustración 3. REACCIÓN GENERAL DE LA GLUCOGÉNESIS ..... 27
Ilustración 4, GLUCOGENÓLISIS ..... 28
Ilustración 5. PORCENTAJE DE MUERTES EN PERSONAS DE 20 A 79 AÑOS DE EDAD. ..... 31
Ilustración 6. ÍNDICE DE MORTALIDAD EN MÉXICO ..... 32
Ilustración 7. LINEALIDAD DE LA GLUCOSA ..... 45

## RESUMEN

La acreditación de un laboratorio de análisis clínico, implica el cumplimiento de la norma ISO 15189, la cual se compone de dos partes principales, una explica toda la parte de documentación y organización del laboratorio y la otra explica la competencia del laboratorio y la competencia técnica del personal. El laboratorio de análisis clínicos de la facultad de químico Farmacobiologia, tiene como objetivo principal obtener la acreditación emitida por la entidad mexicana de acreditación (ema), para lo cual en la norma ISO 15180, en el apartado 5.5.2, indica que el laboratorio debe utilizar sólo procedimientos de examen validados, en el presente trabajo de investigación se tiene como objetivo principal llevar a cabo la validación del método para la determinación y cuantificación del analito glucosa. La parte metodológica se realizó de acuerdo a la guía para la validación y verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio de análisis clínico, emitida por la entidad mexicana de acreditación (ema) y el Centro Nacional de Metrología (CENAM). Los parámetros de desempeño del método que se determinaron fueron linealidad, precisión, veracidad, sensibilidad analítica, límite de detección y límite de cuantificación, para la linealidad se obtuvo un valor de $R^2=0.999$, el cual indica que la función de calibración es lineal en el intervalo evaluado, la precisión se calculó con el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación, los resultados fueron: promedio= 224,6, SD=2.16, %CV=0,0096, para el control 1 y, promedio= 77.17, SD=1.53, %CV= 1.98 para el control 2, el cálculo de la veracidad se realizó por dos métodos, por el cálculo de error relativo y por el cálculo del porcentaje de recuperación los resultados fueron % error=7.14, % de recuperación= 92,80, para la sensibilidad obtuvo un valor de 0.53, el límite de detección del método fue de 0.30 md/dl y el límite de cuantificación fue de 0.74 mg/dl. Para la aceptación tiene que realizarse un comparativo con los resultados de la validación del fabricante, este no emite ningún resultado, a pesar de esto el proceso de la validación se realizó, obteniendo los parámetros solicitados. Sería conveniente pedir la información al fabricante o adquirir un nuevo equipo de laboratorio.

Palabras clave: glucosa, validación, control de calidad, acreditación.

## ABSTRACT

The acreditation of a laboratory clinical of analisis implies compliance ISO 15189, which forms two main parts, an explanation of the all part of the documentation and laboratory oganization and the other explains the competence of the laboratory and the personal technique competence. The Clinical Analysis Laboratory of the faculty of Chemical Pharmacobiology, its main objective is to obtain the accreditation issued by the mexican acreditation entity, in which the ISO 15189 standard, in that section 5.5.2 indicates that the laboratory should be used only validated exams. In the present research theoric its main objective is to carry out the validation of the method for determination and the cuantification of analysis of the glucose. The methodological part was performed according to the guide for the validation and the veryfication of quantitative examination. Employed by the clinical laboratory, isssued by the mexican acredition and the national metrology center. The performance of the parameters method were determined linearity, precision, accuracy, sensitivity, analytical, limit of detection and limit of quantification. Linearity was obtained for R2= 0.999, in which indicates that that calibration function is linear in the range tested. The precision was calculated with the standard deviation and the coeffcient of variation. The results were: average = 2246, SD= 2.16 %, CU = 0,0096, the calculation accuracy was performes by two method for calculating relative error and calculating the percentage of recovery results. The results were % error = 7.14 %, recovey = 92.80 for sentivity obtained a value of 0.53, the limit of the method was 0.30 md/dl. For a comparative acceptance must be made with the results of the validation of the manufactures. Despite this, the process of validation was performed, obtaining the requested of the parameters . It would be covenience to ask the manufacturer information or puchase a new laboratory equipment.

Keywords: glucose, validation, quality control, accreditation.

# ÍNDICE

1. CAPÍTULO I ..... 1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA ..... 1
1.1 INTRODUCCIÓN ..... 2
1.2 PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS ..... 4
1.3 VARIABLES ..... 5
1.3.1 VARIABLES DEPENDIENTES ..... 5
1.3.2 VARIABLES INDEPENDIENTES ..... 6
1.4 OBJETIVOS ..... 6
1.4.1 OBJETIVO GENERAL ..... 6
1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS ..... 6
1.5 DELIMITACIÓN DEL TEMA ..... 7
2. CAPÍTULO II ..... 8
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA ..... 8
2.1 MARCO HISTÓRICO ..... 9
2.1.2 HISTORIA DE LA METROLOGÍA ..... 9
2.1.3 HISTORIA DE LA ISO 15189 ..... 10
2.1.4 ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA DIABETES ..... 13
HISTORIA SOBRE GLUCOSA ..... 13
HISTORIA DE LA ENFERMEDAD ..... 14
¿CÓMO DETERMINABAN LA GLUCOSA EN LA ANTIGÜEDAD? ..... 15
2.2 MARCO LEGAL ..... 16
2.2.1 LEY FEDERAL DE METROLOGÍA ..... 16
2.2.2 ISO 15189 ..... 16
2.3 MARCO TEÓRICO ..... 18
2.3.1 LA VALIDACIÓN ..... 18
IMPORTANCIA DE REALIZAR VALIDACIONES ..... 19
TIPOS DE VALIDACIONES ..... 19
TIPOS DE MÉTODOS A VALIDAR ..... 21
PLANEACIÓN DE LA VALIDACIÓN ..... 22

PARÁMETROS DE DESEMPEÑO A EVALUAR ..... 23
INFORME DE LA VALIDACIÓN ..... 24
2.3.2 LA GLUCOSA ..... 24
2.3.2.1 METABOLISMO DE LA GLUCOSA ..... 25
2.3.2.2 LA DIABETES ..... 31
2.3.2.3 MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA GLUCOSA ..... 36
2.3.3 LA ESPECTROFOTOMETRÍA ..... 38
3. CAPÍTULO III ..... 40
METODOLOGÍA DE LA VALIDACIÓN Y RESULTADOS ..... 40
3.1 MATERIALES ..... 41
3.2 METODOLOGÍA ..... 42
3.3 RESULTADOS ..... 44
3.3.1 LINEALIDAD ..... 44
3.3.3 PRECISIÓN ..... 47
3.3.4 VERACIDAD ..... 49
3.3.5 SENSIBILIDAD ..... 51
3.3.6 LÍMITE DE DETECCIÓN ..... 52
3.3.7 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN ..... 53
CAPÍTULO IV ..... 54
CONCLUSIONES ..... 55
TRABAJO A FUTURO ..... 56
ANEXOS ..... 57
GLOSARIO ..... 60
BIBLIOGRAFÍA ..... 63

# 1. CAPÍTULO I

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

*"Todos los triunfos nacen cuando nos atrevemos a comenzar".*

*Eugene Ware*

## 1.1 INTRODUCCIÓN

Las mediciones que se generan alrededor del mundo son innumerables, la calidad de esas mediciones dependen de que el método analítico utilizado tenga la capacidad suficiente para producir un resultado previsto dentro de intervalos establecidos. La validación es la confirmación de que un método analítico tiene capacidades de desempeño para una aplicación específica, el cual todo el proceso de validación debe estar documentado con evidencias objetivas, ésta es un punto importante en el ámbito de la química clínica, sin embargo todavía existe confusión, entre los químicos clínicos, de cómo realizar una validación. (1)

Los laboratorios de análisis clínicos acreditados o que se encuentran en proceso de acreditación deben de utilizar métodos validados, por esta la razón, el Laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de Químico Farmacobiología (LAC-QFB), dependiente de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, se ve en la necesidad de realizar las validaciones de los métodos analíticos que se utilizan dentro del laboratorio, el objetivo principal de este proyecto, es la realización de la validación del método para la cuantificación de glucosa.

La glucosa es la principal fuente de energía de la mayoría de los organismos vivos, dentro de nuestro organismo la función primordial, es precisamente, la obtención de energía, la cual sirve a las células para realizar múltiples procesos biológicos.

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad causada por la elevación de la concentración de glucosa en sangre, la cual se produce por la poca o nula producción de insulina por parte del páncreas, ésta enfermedad es uno de los padecimientos más comunes en la sociedad, el cual aflige en todo el mundo a un gran número de personas de cualquier condición social. Las cifras sobre esta enfermedad son alertadoras, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el mundo existen más de 347 millones de personas con diabetes, en el año 2004 murieron 3.4 millones de personas de esta enfermedad, se duplicará el

índice de mortalidad entre los años 2005 y 2030, este padecimiento en el continente americano, tiene el tercer lugar de mortalidad, solo por debajo de enfermedades cerebrovasculares. (2) (3)

La diabetes mellitus en México, se encuentra como una de las primeras causas de muerte, alrededor de 6.4 millones de adultos padecen esta enfermedad, esto significa que el 92% de la población mayor en México está diagnosticada con diabetes. La mayoría de la población desconoce su situación de salud, por tanto estas cifras podrían ser mayores. (2)

Existen principalmente tres tipos de diabetes; diabetes tipo I, diabetes tipo II y diabetes gestacional. *La diabetes tipo I* se caracteriza por la nula producción de insulina pancreática, esta deficiencia se debe a una autodestrucción de las células beta del páncreas, se desconoce la causa por la cual estas células se autodestruyen, sin embargo está implicado un mecanismo inmunológico en este tipo de diabetes, debido a que es de origen autoinmune. La enfermedad afecta a cualquier persona de cualquier edad, pero con frecuencia aparece en niños y adolescentes, también pueden intervenir factores genéticos y ambientales. (4) (5)

*En la diabetes tipo II*, existe la producción de insulina, pero ésta es insuficiente, o bien el organismo no responde adecuadamente a esta producción, creando así, una concentración alta de los niveles de glucosa en la sangre, para la diabetes mellitus tipo II, tampoco se conocen las causas principales del desarrollo de la enfermedad, pero existen factores de riesgo como la obesidad, edad avanzada, falta de actividad física, antecedentes familiares, origen étnico, alimentación inadecuada, etc.

*La diabetes mellitus gestacional* se presenta, por primera vez en el embarazo, entre la semana 24 y 28, similar a la diabetes tipo II, ésta se presenta cuando hay una secreción mínima de insulina en la sangre, esto genera una concentración alta de glucosa, la cual se debe a que las hormonas del embarazo afectan a la

sensibilidad de la insulina, los síntomas son similares que a los de la diabetes tipo II. (6)

Para efectos de la validación de métodos analíticos se realizarán la información de todos los parámetros de desempeño estos son: linealidad, precisión, veracidad, límite de detección, sensibilidad analítica, intervalo de trabajo, especificidad analítica e incertidumbre. (7) En el presente trabajo de investigación se hace omisión del cálculo de la incertidumbre, ya que es parte de investigaciones posteriores.

## 1.2 PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS

El Laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de Químico Farmacobiología, brinda servicios de análisis a los universitarios dependientes de la universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Este se encuentra en un proceso de acreditación, para lograr la acreditación del laboratorio, la norma ISO 15189 indica que todos los laboratorios que se encuentran acreditados o en proceso de acreditación, los métodos utilizados deben de estar validados, en torno a estos requerimientos, se establece la siguiente hipótesis.

*"La metodología utilizada para la cuantificación y determinación de glucosa en suero y plasma, usada en el laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de Químico Farmacobiología, cumple con todos los parámetros de desempeño requeridos para su validación".*

Todo proceso de investigación implica encontrar variables de estudio, las cuales pueden ser dependientes o independientes del objetivo de la investigación, el siguiente punto de este capítulo es clasificar las variables de estudio dependientes e independientes encontradas en el estudio de esta investigación.

## 1.3 VARIABLES

Se entiende como variable todo aquel parámetro que puede influir directamente o indirectamente en el análisis de una investigación, esto para satisfacer el cumplimiento de la hipótesis. Tomaremos en cuenta dos tipos de variables, las independientes que influyen de manera indirecta, y las dependientes las que influyen de manera directa. A se enlistan los tipos de variables.

### 1.3.1 VARIABLES DEPENDIENTES

- Temperatura
- Humedad
- Operador
- Ayuno del paciente
- Calibración del equipo
- Reactivos
- Equipo Dimensión XL, clinical chemistry system
- Volumen de la muestra
- Condiciones de la muestra
- Termómetro
- Balanza

### 1.3.2 VARIABLES INDEPENDIENTES

- La toma de muestra sanguínea
- Anticoagulantes
- Pipetas
- Copas
- Propipetas

## 1.4 OBJETIVOS

Para la realización de un trabajo de investigación, se debe tener en cuenta el objetivo, el cual indica si el proceso del estudio se realizó satisfactoriamente, para el análisis posterior de este trabajo se exponen dos tipos de objetivos, el general y los específicos.

### 1.4.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo principal para este trabajo de investigación es realizar la validación del método para la cuantificación de glucosa. Exceptuando el parámetro de incertidumbre.

### 1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Entre los objetivos que se consideran son:

- Cumplir con la norma ISO 15189, específicamente en el apartado 5.5.2 que indica que el laboratorio debe utiliza únicamente procedimientos validados.
- Comprobar mediante la validación que el método es adecuado para la determinación y cuantificación de la glucosa.

- Realizar un prototipo de trabajo para validaciones de métodos, posteriores a este trabajo.
- Brindar a la comunidad universitaria resultados confiables en la determinación de la concentración de glucosa, en suero o plasma.

## 1.5 DELIMITACIÓN DEL TEMA

Para la validación del método, se utilizó el instrumento Dimensión XL, clinical chemistry system, instrumento de medición en el cual se realizan las mediciones de química clínica, como determinación de glucosa, colesterol total, triglicéridos, urea, creatinina, ácido úrico, entre otras pruebas.

La investigación y el estudio para la realización de este trabajo de tesis, fue en el Laboratorio de Análisis clínicos de la Facultad de Químico-Farmacobiología, ahí se realizó toda la parte experimental de este trabajo. La metodología empleada en toda la parte experimental, de este trabajo se obtuvo de la guía para la validación y verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico.

# 2. CAPÍTULO II

# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

*"La verdadera sabiduría está en reconocer la propia ignorancia"*

*Socrates.*

# 2.1 MARCO HISTÓRICO

## 2.1.2 HISTORIA DE LA METROLOGÍA

Desde la antigüedad, el hombre se vio en la necesidad de realizar mediciones, esto con el objetivo de resolver las problemáticas que surgían en el ámbito comercial y laboral, así entonces, las civilizaciones debieron de inventar un sistema de medición, surgiendo así, las primeras medidas de longitud, después se cree que, en el transcurso de los años la agricultura influyó en la invención de lo que serían las unidades de capacidad, realizando intercambios de lo que cada civilización producía, a lo que se le conoció como trueque.

Dentro de las primeras mediciones de longitud que se tienen registros en la antigüedad, son las que se derivan de las partes del cuerpo humano, así entonces, la mano, el codo, el brazo, el pie, los dedos de la mano, eran las unidades de medida que se utilizaban en la antigüedad. En la etapa de la edad media, la gran cantidad de unidades de medidas que se manejaban era extensiva, incluso muchas de ellas tenían el mismo nombre pero sus valores eran diferentes, existía una gran confusión entre los científicos de esa época, por lo cual sintieron la necesidad de generar un sistema de medición que fuera uniforme, exacto e invariable. (8)

Fue en Berlín, cuando la Conferencia Internacional de Geodesia, expuso la importancia de realizar un nuevo sistema de pesos y medidas, donde éste se debiera utilizar en el continente europeo, surgiendo la idea de un nuevo modelo de longitudes, Francia tuvo interés en la idea expuesta por la Conferencia Internacional de Geodesia, en septiembre de 1869, por parte de la consejería de agricultura y comercio, Napoleón III firma el dictamen donde se ordena la realización de una comisión científica internacional, con el fin de divulgar el uso de medidas métricas y generales, y tener un sistema de medida internacional de características similares, dándole así, a Francia la facultad de realizar dicha actividad. (9)

El 16 de noviembre de 1869, Francia hizo la invitación a los países de Austria-Hungría, Baviera, Bélgica, Chile, Colombia, Ecuador, España, los Estados romanos, Estados Unidos de América, Gran Bretaña, Grecia, Italia, Nicaragua, Países Bajos, Perú, Portugal, Prusia y la Confederación de Alemania del Norte, Rusia, San Salvador, Suecia y Noruega, Suiza, Turquía, Venezuela y Württemberg, los cuales aceptaron la invitación. Con la participación de estos países se crearon la Oficina Internacional de Pesas y Medidas ( BIPM ), la Conferencia General de Pesas y Medidas ( CGPM ) y la supervisión del Comité Internacional de Pesas y Medidas ( CIPM ), dando lugar a la convención internacional del metro, firmada en parís en 1875, empezando aquí una nueva etapa en el estudio de la Metrología. (10)

### 2.1.3 HISTORIA DE LA ISO 15189

Básicamente las normas empiezan desde la manera pensante de la humanidad, el ejemplo más simple está en que las diferentes civilizaciones tenían costumbres y normas con las cuales se regían, también se menciona en la literatura que las civilizaciones como caldea y egipcia, estandarizaron los tamaños de los ladrillos y piedras, sin embargo, la normalización con base científica y sistemática, comienza con la revolución industrial a finales del siglo XIX. Los países altamente desarrollados de manera industrial, tenían la necesidad de producir más y con mejor calidad sus productos. El auge de la normalización llego durante la primera guerra mundial, los ejércitos de los países participantes, tenían la necesidad de abastecerse de más y mejores soldados de guerra y armamento, el cual hubo la necesidad de utilizar a la industria privada, a las que se les exigían especificaciones rígidas. (11)

Los ingenieros alemanes Naubaus y Hellmich el 22 de diciembre de 1917, establecen el primer organismo de normalización llamado NADI (Normen-

Ausschuss der Deutschen Industrie), comité de la normalización de la industria alemana, este comité estableció diferentes normas con la denominación DIN, que por sus siglas significa: Deustcher Industrie Normen (Normas de la Industria Alemana). La cúspide de la normalización en esos tiempos era evidente, por consiguiente diferentes países de Europa emitieron rápidamente sus propias normas, por ejemplo en 1918 en Francia se constituyó el AFNOR (Asociación francesa de normalización) y en 1919 la BSI (BritishStandards Institution), en el país de Inglaterra. (12)

En el año de 1926, con el objetivo de ordenar las diferentes aportaciones de los países interesados en la normalización, surge la organización conocida como ISA (Internacional Federación of the National Standardization Associations), en Londres, el cual, durante la segunda guerra mundial, este mismo organismo cambia el nombre por ISO (International Organization for Standardization, por sus siglas en inglés), que en la actualidad es el organismo, no gubernamental, encargado de promover, el desarrollo de normas internacionales de fabricación, comercio y comunicación en todas las ramas industriales a excepción da la eléctrica y la electrónica, estos campos los administra el organismo conocido como IEC (Comision Electronic Internacional). (11), (13) En la Tabla 1 se muestra la evolución histórica de la norma ISO 15189.

**Tabla 1 EVOLUCIÓN HISTÓRICA DE LAS NORMAS**

| AÑO | TÍTULO | COMENTARIO |
|---|---|---|
| 1990 | Guía ISO/IEC 25:1990 Requisitos generales para la competencia técnica de los laboratorios de ensayo. | O en 45001 |
| 1997 | EAL-G25/ECLM-1 Acreditación para los laboratorios clínicos | Publicada por EAL/ECLM |
| 1999 | ISO/IEC 17025:1999 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de calibración y análisis | Se convirtió en EN, en el 2000 |
| 2003 | ISO 15189:2003 Laboratorios clínicos- Requisitos particulares para la calidad y competencia. | Preparado por el comité técnico 212 "Laboratorio clínico y sistemas diagnósticos in vitro" |
| 2007 | ISO 15189:2007 Laboratorios clínicos- Requisitos particulares para la calidad y competencia. | Realizado por los comités internacionales de normalización. |
| 2013 | ISO 15189:2013 Laboratorios médicos-Requisitos particulares para la calidad y la competencia. | Comités internacionales de normalización. |

La organización y certificación de los laboratorios de análisis comienza con las normas ISO/IEC 25 "requisitos generales para la competencia técnica de los laboratorios de análisis y la norma europea EN 45001 "criterios generales para el funcionamiento de los laboratorios de análisis. Posteriormente estos documentos se sustituyeron por la ISO 17025:1999 requisitos generales para la competencia de los laboratorios de calibración y análisis, la cual también se realizó como norma europea. Sin embargo, los laboratorios de análisis estaban en desacuerdo, estos decían que la norma debiera tener consideraciones especiales para los pacientes, abundando en las partes preanalíticas, analíticas y postanalíticas, así en el año del 2003, el comité 212, "laboratorio clínico y sistemas diagnóstico in vitro" crea la

norma 15189:2003 “laboratorios clínicos – requisitos particulares para la calidad y la competencia”. (14)

La acreditación se entiende como el acto en el que una entidad de acreditación, en el caso de México la única entidad de acreditación es la ema, tiene la facultad de reconocer la competencia técnica de los laboratorios de análisis clínicos, de ensayo y de calibración. La norma ISO 15189, que normaliza a los laboratorios de análisis clínicos y banco de sangre y la ISO 17025, que normaliza a los laboratorios de ensayo y de calibración, exponen los reglamentos para que estos laboratorios obtengan su acreditación, uno de los puntos importantes y de los más críticos de estas normas, indica que todo laboratorio acreditado o que este en proceso de acreditación, tiene que utilizar métodos validados. (15) En noviembre de año de 2012 se aprobó la ISO 15189:2013 la cual sustituye a la ISO 2007, el periodo transitorio de esta norma es hasta antes del primero de marzo del 2016, todos los laboratorios acreditados o en proceso acatarán los lineamientos de esta norma. (16)

### 2.1.4 ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA DIABETES

En el siguiente tema se abarcará todo lo relacionado a la historia de la enfermedad de la diabetes, desde la aparición de la glucosa hasta la historia de cómo se determinaba en la antigüedad.

#### HISTORIA SOBRE GLUCOSA

La glucosa, químicamente es un monosacárido, de fórmula condensada $C_6H_{12}O_6$, se encuentra en plantas, frutas, hongos, en algunas formas bacterianas, etc. En los escritos del árabe se encuentra la primera referencia sobre la glucosa, esta data de las décadas de 1100. (17)

En 1747 un farmacéutico alemán de nombre Andreas Marggraf, obtuvo el aislamiento puro de la sacarosa de la remolacha de la caña, en sus diferentes estudios realizados, se encuentra en aislamiento de la glucosa, sin embargo no se dio cuenta de que se trataba de este compuesto, solo que en sus notas realizadas escribió "eine art zucker", se refería a un tipo de azúcar diferente a la que se obtenía de la caña de azúcar. El nombre de glucosa se lo asignó el químico francés Jean Baptiste Andre Dumas. (18)

**HISTORIA DE LA ENFERMEDAD**

Diferentes documentos históricos indican que la diabetes mellitus era ya conocida desde antes del cristianismo, en los manuscritos que se descubrieron por Ebers y Egipto, describen diferentes sintomatologías, que asimilan ser de la diabetes. El médico griego Areteo de Capaducia, describe las enfermedades clásicas de esa época como la tuberculosis, la difteria y la epilepsia, éste escribió su opinión sobre la diabetes, el cual decía que era una enfermedad fría y húmeda, en que la carne y los músculos, de los enfermos se diluían y después convertirse en orina, él fue quien le da el nombre por primera vez de diabetes. En 1679 Tomas Willis, describe de forma magistral el concepto de diabetes, fue quien le dio el nombre de diabetes mellitus, refiriéndose al sabor dulce de la orina. (19)

Durante años posteriores, los filósofos, científicos e investigadores, siguieron profundizando en el tema de la diabetes. Mathew Dobson, médico británico fue el primero que realizó estudios utilizando grupos de personas, éste se dio cuenta que un grupo de personas tenían concentraciones de glucosa en la sangre y en la orina, describiendo los síntomas de esta enfermedad. La filosofía de Dobson decía que el azúcar se formaba en la sangre por defecto de la indigestión y que solo se limitaba a excretarse por medio de la orina. Otro de los avances más significativos, sobre la enfermedad de la diabetes, lo dio el filósofo Claude Bernard, él se dio cuenta que la glucosa que se encontraba en la orina de las personas enfermas, había estado anteriormente en el hígado, en forma de glucagón, este filósofo siguió con sus investigaciones y observó mediante una

glucemia provocada a un conejo, que el sistema nervioso central estaba involucrado en el control del azúcar en la sangre. Hizo también investigaciones sobre el páncreas, el cual no obtuvo mayor éxito, pero que sirvió para investigaciones posteriores. Después de diferentes investigaciones en el año de 1921, con la ayuda de un estudiante de prácticas de química, la insulina fue descubierta por Sir Frederick Grant Banting, obteniendo así, por su gran trabajo el premio Nobel de medicina en 1923. (20)

**¿CÓMO DETERMINABAN LA GLUCOSA EN LA ANTIGÜEDAD?**

Como se mencionó anteriormente la enfermedad de la diabetes mellitus se conoce desde ya hace varios años, la detección de la glucosa también se empezó a realizar desde la antigüedad, en China, por ejemplo, observaban que las hormigas se sentían atraídas con las muestras de orina que contenían altas concentraciones de glucosa. Otra de las técnicas de la determinación de la glucosa en orina, en la antigüedad, era la degustación de la misma, para el monitoreo de la enfermedad, los pacientes enfermos debían de probar sus orinas. Otros de los métodos para la determinación de glucosa en orina, es el que se basa en el reactivo de Benedict, este en la actualidad se sigue utilizando, no tanto para la determinación de glucosa, si no que en bodegas, en la que se identifica los azucares en vinos. En la actualidad la mayoría de los laboratorios, cuantifican la glucosa en sangre de manera automatizada. (21)

## 2.2 MARCO LEGAL

Para fines de este capítulo, analizaremos las principales leyes y normas, que sirven para que de manera legal, se realice la validación de lo expresado en este trabajo, así también los institutos y organizaciones nacionales e internacionales que emiten las normas y leyes.

### 2.2.1 LEY FEDERAL DE METROLOGÍA

Se integra principalmente por seis títulos. El título primero contiene las disposiciones generales, el segundo se refiere al tema de la metrología, el tercero que regula la normalización, el cuarto contiene las disposiciones generales sobre acreditación y certificación, el título quinto regula los procesos de verificación y en el último se conjuntan las disposiciones sobre incentivos, sanciones y recursos. Es de suma importancia conocer esta ley. El objetivo principal en términos de metrología, es poder implementar el sistema internacional de unidades y de medida, tener un control de todos los aparatos que se utilizan para la medición, fabricación, importación, venta, verificación y uso de los mismos. En términos de normalización, certificación, acreditación y verificación, el objetivo de esta ley es coordinar las labores de acreditación, certificación, verificación de los diferentes laboratorios de gobierno y privados. (22)

### 2.2.2 ISO 15189

Esta es la norma que tiene los lineamentos para poder lograr la acreditación de los laboratorios de análisis clínicos, se divide principalmente en dos partes, una de la que nos habla sobre el sistema de gestión de la calidad y la otra describe la parte técnica, tanto del personal como, instalaciones, equipos, procedimientos, garantía de calidad e informes. La norma consta principalmente de siete puntos, en el primero se describen los objetivos y el campo de la aplicación, en el punto dos las referencias y compatibilidad con otras normas, en el tercer punto se exponen los términos y definiciones para un entendimiento mayor de la norma. (23)

El punto cuatro describe los requisitos para un sistema de gestión de la calidad, ese punto costa a su vez de otros 15 puntos, estos son: 4.1. Organización y Gestión, 4.2. Sistema de gestión de la calidad, 4.3. Control de los documentos, 4.4. Revisión del contrato, 4.5. Análisis efectuados por laboratorios de referencia, 4.6. Servicios externos y suministradores, 4.7. Servicios de asesoramiento, 4.8. Resolución y quejas, 4.9. Identificación y control de las no conformidades, 4.10. Acción correctiva, 4.11. Acción preventiva, 4.12. Mejora continua, 4.13. Registros técnicos y de calidad, 4.14. Auditorías internas, 4.15. Revisión de la Gestión. (23)

Los requisitos técnicos los describen en el punto cinco de la norma, este punto se divide en ocho puntos: 5.1. Personal, 5.2. Instalaciones y condiciones ambientales, 5.3. Equipo del laboratorio, 5.4. Procedimiento pre-examen, 5.5. Procedimiento de examen, 5.6. Aseguramiento de la calidad de los procedimientos de examen, 5.7. Procedimiento post-examen, 5.8. Informe de resultados. (23)

En los puntos 5.5 hace hincapié en la validación de los métodos de examen, puntualmente el apartado 5.5.2 indica que: “el laboratorio debe utilizar únicamente procedimientos validados para confirmar que los procedimientos de examen son apropiados para el uso al que está destinado”. (23)

El punto seis indica la bibliografía citada y el siete la concordancia con otras normas internacionales.

En el siguiente tema, analizaremos la teoría que corresponda a este a la validación.

# 2.3 MARCO TEÓRICO

## 2.3.1 LA VALIDACIÓN

La validación es una de los puntos críticos que se pide en la norma 15189, para que un laboratorio de análisis clínico logre su acreditación. En el siguiente capítulo se realizara la revisión bibliográfica de la parte de validación.

La validación de un método analítico se puede definir como la necesidad de estimar las capacidades de desempeño de un método del cual se debe registrar evidencias objetivas. Se entiende que para realizar un procedimiento de validación implica utilizar equipo de laboratorio, al cual antes de empezar la validación estos deben tener ciertas especificaciones, tales como, estar bien calibrados y estar trabajando adecuadamente. Todo laboratorio de análisis clínicos que comience con procesos de validación y/o verificación de métodos, debe demostrar que tiene competencia técnica, para la realización de dichas actividades. Los datos de desempeño de un método para la validación, los informan los fabricantes en los instructivos de los reactivos, sin embargo los laboratorios deben comprobar que estos datos se cumplen, bajo las condiciones propias del laboratorio. (1), (24)

Si bien las validaciones se encuentran de la mano con la acreditación, haciendo uso de los datos emitidos por la ema, en el estado de Michoacán, todavía el conocimiento sobre validación, es deficiente entre los químicos clínicos, el hecho está en que, por el momento, ningún laboratorio de análisis clínico se encuentra acreditado. (25)

La validación de un método se requiere cuando se necesite verificar que sus parámetros de desempeño son adecuados para un uso específico, por ejemplo la validación se puede empezar cuando se desarrolla un método nuevo por el laboratorio, cuando un mismo método es utilizado con diferente instrumento y diferente analista, esto para verificar que el desempeño no sea afectado por dichos cambios, cuando el control de calidad interno indica variaciones

significativas, en la comparación de dos métodos, uno nuevo y el otro de referencia, esto para verificar de que el método en cuestión es equivalente al método de referencia. (26)

**IMPORTANCIA DE REALIZAR VALIDACIONES**

La responsabilidad de un resultado, producto del análisis de un analito, recae en el deber profesional del químico analista. Las validaciones de métodos analíticos, expresan que un laboratorio tiene la capacidad de emitir resultados confiables, de esta manera, los laboratorios que realizan actividades de validación, la dan la certeza al cliente de que sus resultados son confiables. (1)

Una de las importancias del por qué se deben validar y verificar los métodos de un laboratorio de análisis clínico, es para brindar una adecuada medición de los analito y así satisfacer las necesidades metrológicas, que requieren los médicos, para realizar un adecuado diagnóstico, y por consecuencia un manejo correcto de su paciente (24). Al realizar la validación de un método estamos determinando la confiabilidad el instrumento, así también la técnica y la metodología aplicada para la cuantificación del mensurando. En el proceso de validación, se detectan también, la presencia de errores. (27)

**TIPOS DE VALIDACIONES**

VALIDACIÓN TOTAL: Este tipo de validación se realiza cuando un laboratorio produce un método nuevo o cuando éste no esté normalizado, el cual debe de validarse todos los parámetros de desempeño emitidos por las diferentes guías, para la validación de métodos. (26)

VALIDACIÓN PARCIAL: Se entiende por validación parcial, aquella que no cumple con uno de los parámetros de desempeño, un ejemplo de validación parcial, puede ser la verificación. Ésta se realiza cuando existe una modificación menor a un método normalizado, o cuando éste haya sido validado y se necesite realizar la validación por segunda ocasión, esta vez solo se realizará una validación parcial. (26)

REVALIDACION: Es aquella validación en donde se tienen la validación ya sea parcial o total, esta se aplica cundo hay cambios significativos de algunos de los componentes de la formulación, aplica solo en validaciones de tipo farmacéutico. Cuando existe algún cambio de un equipo automatizado o el cambio de alguna pieza del mismo, se realizará también, dicha validación. Los siguientes tipos de validación son aplicables en laboratorios farmacéuticos. (28)

VALIDACION PROSPECTIVA: En el campo farmacéutico, estas validaciones se realizan antes de implementar los procesos de la misma, se realiza un análisis de riesgo en la etapa de desarrollo y durante el proceso de producción. (29)

VALIDACION CONCURRENTE: En este tipo de validación se tienen que realizar una recolección de datos durante el monitoreo de la producción, la recolección de datos se da durante varios ciclos del proceso. Los datos recolectados se evaluarán y se determinará si el proceso es válido. Es recomendable para establecimientos que tienen varios años de ejecución de un mismo método, el cual todo el procedimiento de producción se tiene bien controlado. (26)

VALIDACION RETROSPECTIVA: Para este tipo de validación se recurre a la información histórica del proceso. Para el análisis de los datos, se tomará en cuenta como mínimo tres lotes, con el que se cuenten con reportes sólidos y confiables. Es necesario tener en cuenta, para el análisis de esta validación, que las áreas de la industria estén bien controladas. Este tipo de validación es válida cuando los procesos de manufactura están debidamente consolidados, no es aplicable para procedimientos en donde se haya realizado cambios recientes, como en la composición del producto, en los procedimientos de fabricación de los equipos. (29) (28)

**TIPOS DE MÉTODOS A VALIDAR**

Para poder elegir qué tipo de validación se realiza, tendremos que estudiar los tipos de métodos, ya que el tipo de validación, que se determinará, está en relación estrecha con el tipo de método. Los tipos de métodos que se pueden encontrar en un laboratorio son: métodos normalizados, métodos no normalizados y métodos modificados.

METODOS NORMALIZADOS: Son aquellos métodos que se encuentran publicados por alguna organización, nacional e internacional, o por algún otro organismo reconocido. Entre las principales organizaciones de normalización que emiten metodologías normalizadas se encuentran, ISO, ASTM, FDA, IUPAC, AOAC, ETC. Los métodos emitidos por estas organizaciones, son aceptadas por sectores técnicos, por tanto las validaciones realizadas, de estos tipos de métodos, se harán con lo establecido en los certificados emitidos por estas organizaciones. (30)

METODOS NO NORMALIZADOS: estos tipos de métodos son desarrollados por organismos no reconocidos. Pueden ser métodos desarrollados dentro del propio laboratorio. Los métodos que se modifican, se extienden o se aplica de manera diferente al original se le llamará también, como método no normalizado. (31), (30)

**PLANEACIÓN DE LA VALIDACIÓN**

Es importante que al empezar el procedimiento de validación tener un plan de ejecución, esto para tener una visión objetiva de lo que será el trabajo de validación, para tal fin se sugiere los siguientes puntos. (30)

- Como primer punto, definir los objetivos, el alcance del método y en qué lugar se realizará la validación.
- Definir cuáles serán los parámetros de evaluación del método, y en conjunto definir los criterios de aceptabilidad.
- Especificar cuáles serán los ensayos, pruebas o experimentos para la validación, en este punto se realizará los cálculos para los experimentos a realizar.
- Verificar los instrumentos en el cual se llevará a cabo la validación, estos debieran de estar en condiciones de calibración y mantenimiento.
- Identificar y caracterizar todos los materiales, así como también los calibradores y reactivos que se emplearán en la validación.
- Llevar a cabo los experimentos preliminares de la validación.
- Ajustar los parámetros de desempeño y aceptación de los criterios, si fuera necesario.
- Llevar a cabo de manera complementaria todos los experimentos ensayos y pruebas de la validación.
- Realizar un procedimiento para la realización del método de manera rutinaria.
- Realizar un criterio de la periodicidad para la realización de la revalidación.
- Definir cuál será la frecuencia para la verificación del control de calidad del método validado.
- Todo el procedimiento de validación estará debidamente documentado de manera objetiva.

**PARÁMETROS DE DESEMPEÑO A EVALUAR**

Cabe mencionar, que existe una diferencia significativa entre realizar una validación y realizar una verificación. La validación se expresa como la confirmación de que un método es adecuado para una aplicación específica, el cual todo el proceso de validación tiene que documentarse de manera objetiva. La verificación se realiza solo cuando un método ya ha sido validado, este consiste en evaluar el desempeño del método, y así demostrar que cumple con los requisitos para un uso específico, en el cual se especificó en los resultados de la validación. Cuando en un laboratorio se valida por primera vez o cuando este desarrolla sus propios métodos, se realizará todos los parámetros de desempeño, estos son: (7)

- Linealidad
- Precisión
- Veracidad
- Límite de detección
- Límite de cuantificación
- Sensibilidad analítica
- Intervalo de trabajo
- Especificidad analítica
- Incertidumbre

Para el caso de la verificación solo se realizarán los siguientes parámetros de desempeño:

- Linealidad
- Precisión
- Veracidad
- Incertidumbre.

**INFORME DE LA VALIDACIÓN**

Una vez concluida la etapa de validación, es importante documentar todos los procedimientos realizados, el laboratorio realizará un informe de validación en donde se documentará todo el proceso. El informe deberá contener por lo menos lo siguientes puntos: (30)

- Identificación del método validado
- Referencia de la normatividad en la que se basó para realizar la validación
- Interpretación estadística de los resultados
- Conclusión de la validación.

## 2.3.2 LA GLUCOSA

Los carbohidratos o también llamados glúcidos son compuestos que en su estructura química, tienen grandes cantidades de grupos hidroxilo, los glúcidos más simples, tienen solo un grupo aldehído, a los que se conoce como polihidroxialdehidos. Los carbohidratos o hidratos de carbono, se clasifican de acuerdo a la cantidad de monosacáridos que presentan en su estructura, estos son, monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos.

El monosacáridos más importante y abundante, es la glucosa, la importancia radica, en que este monosacáridos es la principal fuente de energía de la mayoría de los organismos. (32)

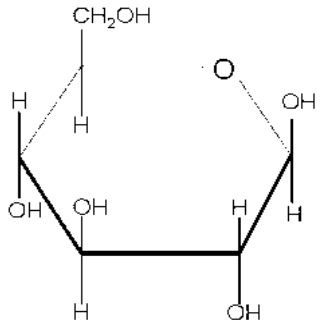



**ILUSTRACIÓN 1.ESTRUCTURA CÍCLICA DE LA GLUCOSA**

### 2.3.2.1 METABOLISMO DE LA GLUCOSA

El metabolismo de la glucosa depende de la demanda de las funciones del organismo. La producción de energía por conversión a dióxido de carbono y agua, el almacenamiento de energía como glucógeno en el hígado o como triglicéridos en el tejido adiposo, la conversión de cetoácidos a aminoácidos o proteínas, son las funciones que desempeña la glucosa para su metabolismo. Las reacciones que se presentan en el metabolismo de la glucosa son demasiadas complejas, en el cual interaccionan con el metabolismo de lípidos y de los aminoácidos. En el metabolismo de la glucosa ocurren diferentes fases las cuales son: glucogénesis, glucugenólisis, gluconeogénesis y glucólisis. A continuación se expondrán cada una de estas fases. (33)

***GLUCOGÉNESIS***

El glucógeno es la formación de cadenas ramificaciones de glucosa, se clasifica como un polisacárido, por poseer varias cadenas ramificadas de D-glucosa. Esta es la forma de cómo se almacena los carbohidratos, tanto en las plantas como en los animales. El glucógeno sintetizado se acumula en el hígado y en los músculos, la función principal de éste es la reserva de energía.

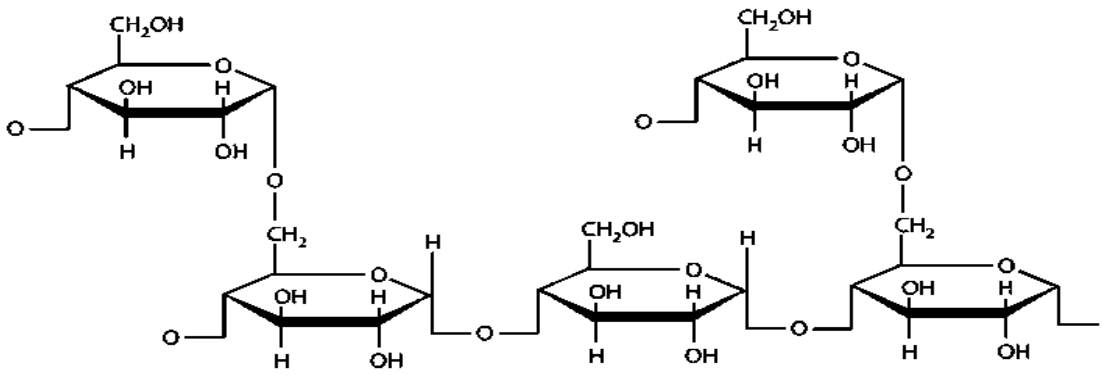


**ILUSTRACIÓN 2. ESTRUCTURA DEL GLUCÓGENO**

La glucogénesis se refiere a la síntesis del glucógeno. En el comienzo de la reacción, se convierte la glucosa-6-P por la fosfoglucomutasa, a ésta se le enlaza un ATP dando lugar a UDP-glucosa:

Glucosa-1-P + ATP ⟶ UDP- glucosa + pp

La enzima glucógeno sintasa, mete a la glucosa mediante un enlace 1,4 al glucógeno liberando UDP. (34)

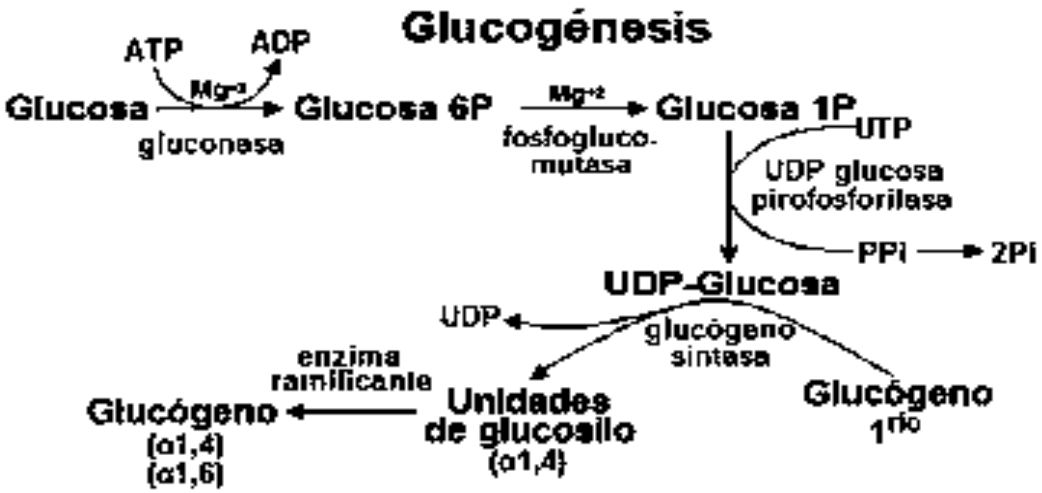



**ILUSTRACIÓN 3. REACCION GENERAL DE LA GLUCOGÉNESIS**

La insulina estimula la realización de la glucogénesis, por tanto el glucagón estimula el rompimiento del glucógeno, dando lugar a la formación de glucosa, aumentando así la concentración de azúcar en el torrente sanguíneo.

***GLUCOGENÓLISIS***

El proceso de la glucogenólisis significa el rompimiento de las cadenas del glucógeno, para la formación de glucosa de manera rápida, esta se realiza cuando los niveles de glucosa en la sangre son bajos (35). En el momento que se efectúa las reacciones de la glucogenólisis, el proceso inverso a esta se encuentra inhibido, la epinefrina y el glucagón son los responsables de generar el proceso de glucogenólisis. En el primer paso de la reacción, mediante la acción de la enzima glucógeno fosforilasa, el glucógeno se degrada a glucosa-1-fosfato. La glucógeno fosforilasa se encarga de la regulación de esta vía, rompiendo los enlaces alfa-1-4 y alfa-1-6. En el segundo paso de la reacción, la glucosa-1-fosfato, pasa a glucosa-6-fosfato, por la acción de la fosfoglucomutasa. En el último paso de la reacción, finalmente de la glucosa-6-fosfato se genera la formación de la glucosa, esta por la acción de la enzima glucosa-6-fosfatasa. (34)

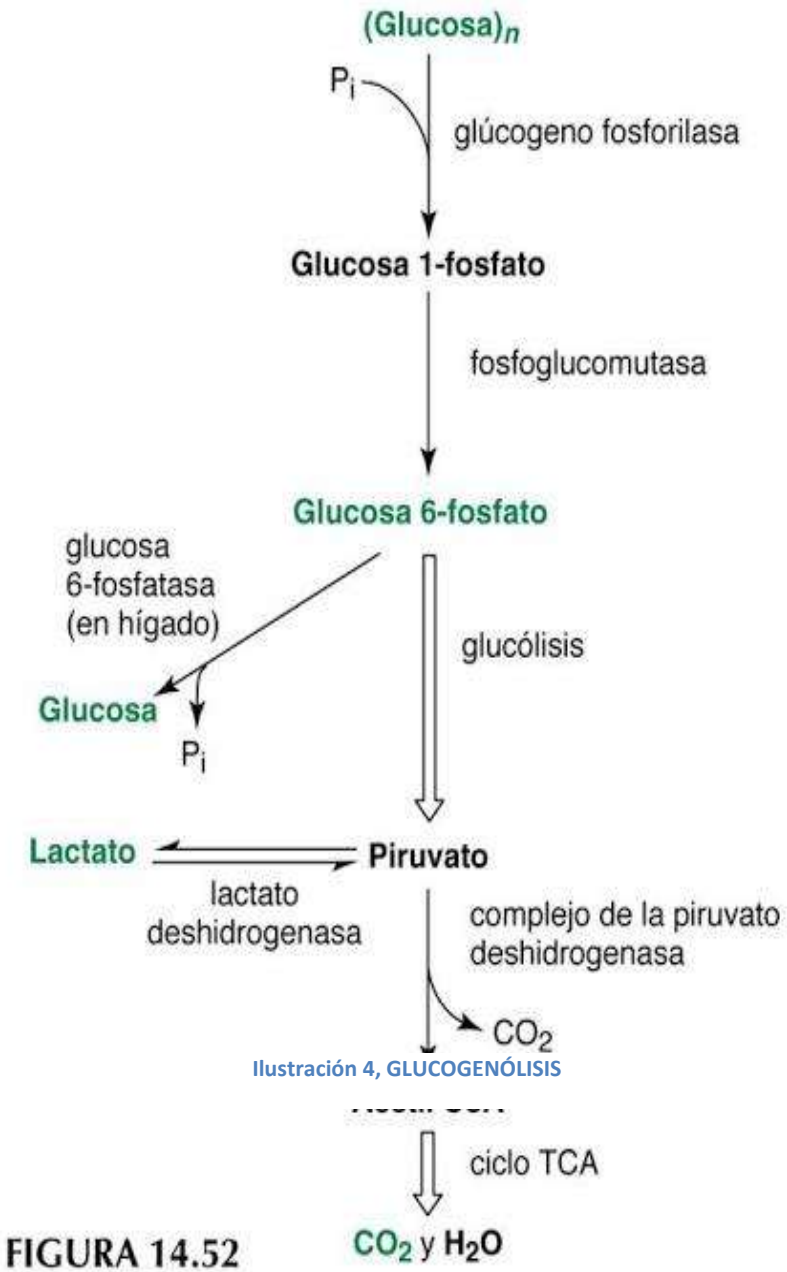



Ilustración 4, GLUCOGENÓLISIS

**FIGURA 14.52**

© John Wiley / Reverté. **Thomas M. Devlin**

*Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas 4ª Ed.*

***GLUCONEOGÉNESIS***

Los tejidos como el cerebro, el eritrocito, el músculo, requieren un aporte continuo de glucosa, el consumo de energía solamente del cerebro es de 120 g por día. Las reservas de la glucosa, expresados en glucógeno, solo son suficientes para satisfacer las necesidades energéticas de un día, el ayuno o esfuerzos prolongados de trabajo requieren otro sistema alternativo de la obtención de glucosa. Para la obtención de glucosa cuando existe un ayuno prolongado, se realiza la síntesis de glucosa conocida como gluconeogénesis. Esta ruta metabólica, implica la síntesis de glucosa a partir de compuestos con tres y cuatro átomos de carbono no glúcidos.

Los principales precursores de la síntesis de glucosa a partir de la gluconeogénesis son el glicerol, el lactato y los cetoácidos piruvato y oxalacetato. La mayoría de las reacciones implicadas en la gluconeogénesis, se realizan en hígado, riñones y epitelio. La gluconeogénesis es el proceso inverso de la glucólisis, sin embargo de las once reacciones que se generan en la glucólisis sólo ocho de ellas son comunes, estas ocho reaccione se dicen que son reversibles, mientras que las restantes son irreversibles de la fase glucolítica, en esta etapa de reacciones la fase gluconeogénesis toma otra ruta diferente de reacciones. (34)

***GLUCÓLISIS***

La glucólisis es otra de las vías metabólicas de los organismos vivos, anaerobios y aerobios, las reacciones de la glucolisis, se realizan en el citoplasma, en la cual se oxidan diferentes tipo de glúcidos para generar energía. La reacción general de la glucolisis se muestra sencilla, se rompe una molécula de glucosa para generar dos moléculas de piruvato con la cal se generan dos moléculas de ATP y NADH + $H^+$. (36)

El balance neto de la reacción global de la glicolisis es la siguiente:

$$\text{Hexosa} + 2\ NAD^+ + 2\ ADP + 2\ Pi \longrightarrow 2\ NADH + 2\ \text{piruvato} + 2\ ATP$$

***EL GLUCAGÓN, LA ADRENALINA Y LA INSULINA***

El glucagón, la insulina y la adrenalina son importantes en la homeostasis de la glucosa, el glucagón y la adrenalina realizan funciones opuestas al metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas, mientras que la insulina regula la cantidad de glucosa en la sangre.

**El glucagón:** Hormona que es sintetizada en las células del páncreas, células alfa de las islotes de Langerhans, esta no participa en la regulación de la vía metabólica glucogenólisis en las células musculares. El principal sitio de acción de esta hormona se encuentra en el hígado, por lo cual estimula la producción de glucosa mediante la glucogenólisis. (35) El glucagón tiene en su estructura una sola cadena de polipeptídica, el cual carece de enlaces bisulfuros, la mayoría de la aminoácidos estimulan la rápida secreción de esta hormona, particularmente la arginina es la que provoca de manera abundante esta acción. (37)

**La adrenalina:** La adrenalina también es conocida como epinefrina, hormona que se produce en las glándulas suprarrenales, cuando esta es secretada se contraen los vasos sanguíneos, el ritmo cardiaco aumenta, los conductos del aire se dilatan, entre otras más funciones. (38) Esta hormona es secretadas cuando hay situaciones de estrés o cuando la glucosa en la sangre es muy baja, al igual que el glucagón estimula la producción de la glucosa, participa también como regulador en el metabolismo del glucógeno hepático. (38)

**La insulina:** la insulina es una hormona que se sintetiza en las células beta de los islotes de Langerhans, en el páncreas, se clasifica como un polipéptido, el cual consta de dos cadenas de aminoácidos, una cadena A y una B, la primera consta de 21 aminoácidos y la otra de 30 aminoácidos, antes de que se sintetizara la insulina humana, la porcina y la bovina fueron las que se utilizaban en la terapia de la diabetes mellitus. La función principal de la insulina, es la realización de un balance en la producción de la glucosa y la utilización de esta en los tejidos.

### 2.3.2.2 LA DIABETES

La diabetes mellitus es uno de los trastornos más importantes causados por la alta concentración de glucosa en la sangre, es por eso que es importante mencionarla en este trabajo de investigación. La diabetes mellitus es una de las principales causas de mortalidad a nivel internacional, entre la complicación más importantes de la diabetes y de la cual es la principal causa de muerte, son las enfermedades cardiovasculares, del cual puede representar hasta más del 50% de los fallecimiento en las poblaciones. Se encontró que en los países que cuentan con el mayor índice de personas afectadas por la enfermedad, tienen también el mayor número de mortalidad. India, China Estados Unidos y la Federación de Rusia, son los países que cuentan con el más alto nivel de personas que padecen diabetes mellitus. En la siguiente figura muestra el

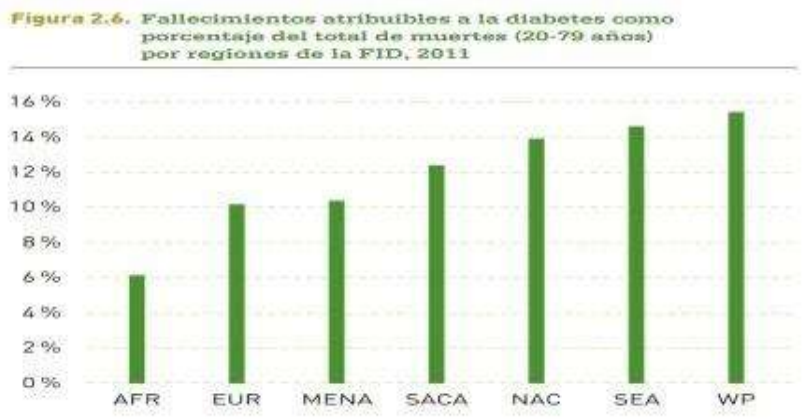



Ilustración 5. PORCENTAJE DE MUERTES EN PERSONAS DE 20 A 79 AÑOS DE EDAD.

Porcentaje de muertes que se presentaron entre personas con edades que van de 20 a 79 años de edad, esto en los diferentes países que cuentan con la mayor incidencia de la enfermedad. (39)

En los últimos años la violencia en México se ha incrementado considerablemente, con ello también el índice de defunción ha alcanzado cifras importantes, sin

embargo la diabetes mellitus en México no deja de ser un grave problema de salud, las cifras de mortalidad que se encontraron en México son considerablemente graves. La enfermedad de la diabetes mellitus ocupa el primer lugar de defunción en este país, está por encima de las muertes causadas por homicidios, causados por el crimen, y de enfermedades como la cirrosis e incluso por encima de defunciones causadas por accidentes vehiculares. Se realizó un análisis de 100 mil habitantes en los años de 1938 al 2011, en la siguiente tabla se representa los datos obtenidos. (40)

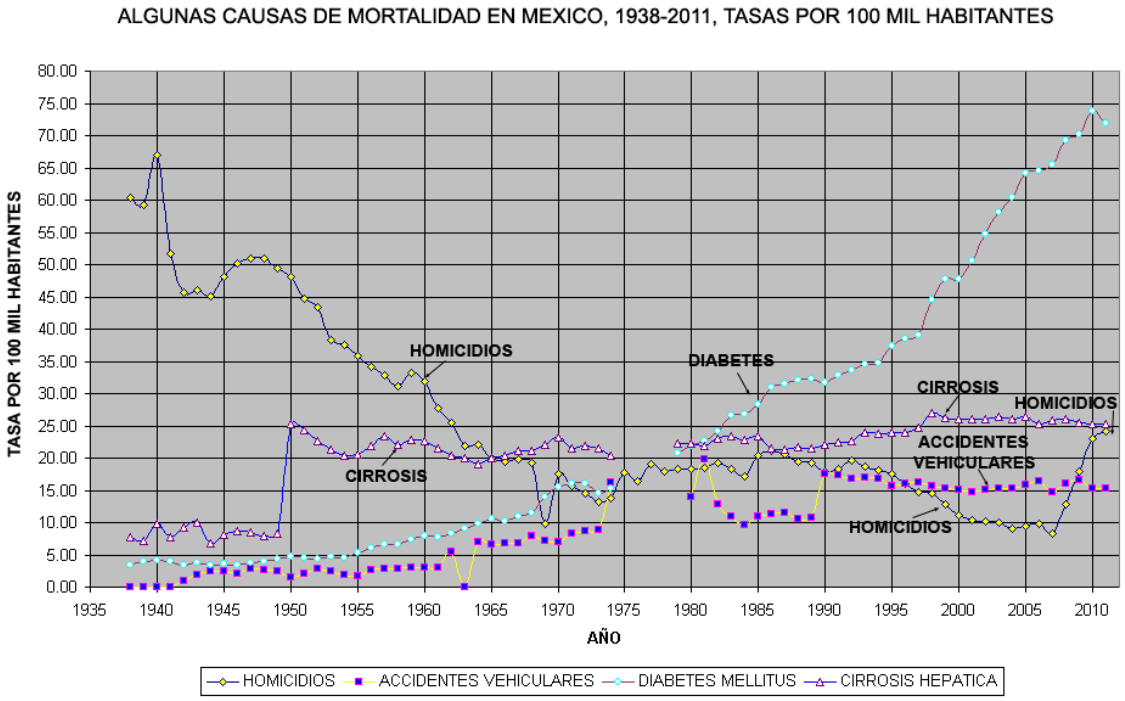



Ilustración 6. INDICE DE MORTALIDAD EN MÉXICO (40)

Se observa que esta enfermedad ha ido incrementándose, en la actualidad representa la principal causa de muerte en México.

Es relevante mencionar que la elongación de la concentración de glucosa en el torrente sanguíneo y la gravedad de este, traen consigo complicaciones que afectan al individuo que tiene la enfermedad. Entre las complicaciones más destacadas tenemos: pérdida de la visión, complicaciones renales, afectación en

los vasos arteriales, cardiopatías y un incremento de la enfermedad vascular cerebral, pero el conjunto de enfermedades que afecta con más frecuencia son las que se trata del sistema nervioso, englobando tanto al sistema nervoso central como al sistema nervioso autónomo. (6)

Las causas por la que se presenta la enfermedad depende del tipo de diabetes mellitus, los principales tipos de diabetes que se conocen y que se presentan con mayor frecuencia son la diabetes mellitus tipo I, la diabetes mellitus tipo II y la diabetes mellitus gestacional o del embarazo. (41)

***DIABETES MELLITUS TIPO I***

La diabetes mellitus del tipo uno, se refiere a la nula secreción de insulina por parte del páncreas, los pacientes que presentan esta enfermedad, se dice que son insulinodependientes, dependen de la administración de insulina para su supervivencia. Esta tipo de diabetes, representa el 25% de todos los pacientes con diabetes mellitus. La patología de esta enfermedad se encuentra en la destrucción de las células de los islotes de Langerhans, ubicados en el páncreas. (42)

Los factores genéticos, ambientales y virales son los principales causas que ocasionan esta enfermedades, los investigadores genéticos han estudiado la enfermedad, encontrando 18 localidades genéticas implicados con la diabetes tipo 1, estas son IDDM1-IDDM18, sin embargo no ha encontrado aún la causa precisa de la aparición de la diabetes mellitus tipo 1, en las últimas décadas ha aumentado el número de personas enfermas de diabetes mellitus del tipo 1. La enfermedad se da con mayor frecuencia en niños y adolescentes, sin embargo puede aparecer a cualquier edad. (43)

***DIABETES MELLITUS TIPO II***

La diabetes tipo 2, es la diabetes más conocida y abundante, representa casi el 90% de los casos de personas diabéticas, en este tipo de diabetes las células del cuerpo no responden correctamente a la insulina, esta condición implica que con el paso del tiempo, el páncreas puede llegar a secretar cantidades inadecuadas de insulina. Se presenta en personas adultas, pero se da el caso que la presente en niños, los factores predisponentes de esta enfermedad es la falta de ejercicio, la edad avanzada, la obesidad, el sedentarismo y en menor proporción los factores genéticos. (44) Entre los factores predisponentes que presentan un alto grado de mortalidad, son los que se refieren a los problemas cardiovasculares, el riesgo de mortalidad para los pacientes con diabetes mellitus tipo II, que presentan problemas de mortalidad es de tres veces mayor, sin embargo muchos de los pacientes que presentan este tipo de padecimiento ni si quiera se dan cuenta de la gravedad del problema. (45)

***DIABETES GESTACIONAL***

La diabetes del embarazo o también conocida como diabetes gestacional aparece durante la gestación entre la semana 24 y 28, este tipo de diabetes es similar que la diabetes mellitus tipo 2, en donde las células del cuerpo no detectan de forma adecuada la presencia de glucosa. La diabetes mellitus gestacional se detecta durante el embarazo, esto significa que si ésta se diagnostica antes del embarazo, está ya no sería gestacional, si no del tipo 1 o 2. (6) (46)

El tener diabetes mellitus durante el embarazo puede causar varias complicaciones riesgosas, sin embargo, se puede controlar mediante ejercicio, una dieta saludable e incluso con medicamento, la enfermedad puede desaparecer después del parto, no obstante si ha tenido la enfermedad el riego de que se pueda presentar nuevamente está latente. (46)

***DIAGNÓSTICO***

Para el diagnóstico de la diabetes mellitus se realizan diferentes pruebas, estas indican que existe una tolerancia anormal de la glucosa en el paciente enfermo, dentro de las pruebas que se realizan para el diagnóstico de la diabetes se encuentra la determinación basal de la glucosa y la realización de pruebas en la que se administra al paciente una sobrecarga de glucosa, el cual se conoce la cantidad de glucosa administrada.

**Determinación de glucemia basal:** para la realización de esta prueba, se realiza una cuantificación de la glucosa en sangre, para esto, el paciente debe de tener por lo menos de 10 a 16 horas de ayuno, si el paciente presenta valores de 110 mg/dl, se considera como un valor normal, si el valor de la cuantificación se encuentra entre 110 y 140, la prueba se tiene que realizar nuevamente ya que son dudosos y tienen que ser confirmados, si el resultado se encuentra por encima de 140 mg/dl indica una probabilidad mayor de contener la enfermedad.

## PRUEBAS DE SOBRE CARGA

**Prueba de sobrecarga oral de glucosa:** esta prueba indica de manera definitiva el diagnóstico de la diabetes, para la realización de esta prueba se tiene que tener un ayuno de por lo menos 72 horas, realizar una dieta baja en carbohidratos, no exceder un rango de 150 a 200 gramos por día. En el comienzo de esta prueba, se realiza una extracción de sangre, para cuantificar la glucosa basal, esta cuantificación servirá para la comparación de los resultados posteriores. Después se le pide al paciente que ingiera una bebida, esta contiene una cantidad de glucosa conocida. Posteriormente se realiza la cuantificación de glucosa cada 30 minutos durante 2 horas. Si a las dos horas, la concentración de glucosa en sangre es mayor a 200 mg/dl, al paciente se diagnostica como diabético, en un paciente sano la concentración de glucosa a las dos horas no debe exceder los 200 mg/dl. (47)

**Prueba de O´Sullivan:** la prueba de O´Sullivan se les practica a las mujeres embarazadas durante la 23 semana de gestación, se administra 50 gr de glucosa por vía oral, se cuantifica la concentración de glucosa sanguínea a la primera hora de haber ingerido la dosis de glucosa, el resultado obtenido debe ser menor a los 140 g/dl, en cambio, si éste se encuentra entre 140m y 180 g/dl, se le pedirá la realización completa de la prueba de sobrecarga oral de glucosa. (47) (48)

#### 2.3.2.3 MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA GLUCOSA

Para la determinación de la glucosa en sangre existen varios métodos, los métodos que se utilizaban en un principio eran los que se basaban en el poder que tiene la glucosa para reducir los iones de cobre, e iones cúpricos ($Cu^{+2}$) a iones cuprosos ($Cu^{+}$).

En la actualidad se utilizan enzimas como reactivos para la determinación de la glucosa, en el cual se emplea la técnica de espectrofotometría para la cuantificación. El método de la glucosa oxidasa y el método de la hexoquinasa, son los métodos principales en donde se emplean estas enzimas para la cuantificación de la glucosa. (49)

Método de la glucosa oxidasa

La enzima utilizada para este método de cuantificación es la glucosaoxidasa, el método es uno de los más específicos y de mayor utilidad en la actualidad. La reacción se lleva a cabo en dos fases, en la primea parte de la reacción la glucosa oxidasa (GOD) oxida a la beta D-glucosa, generando peróxido de hidrógeno y glucorónico. (49)

$$\text{Beta D-glucosa} \xrightarrow{\text{GOD}} \text{Gluconolactona} \xrightarrow{H_2O + O_2} \text{A. glucónico} + H_2O_2$$

En la segunda etapa de la reacción se conjuga un sistema enzimático, en donde el peróxido de hidrógeno formado se une a través de una peroxidasa (POD) se une a un receptor cromogénico, el cual se puede medir espectrofotométricamente. (49)

$$H_2O_2 + \text{Receptor Cromogénico} \xrightarrow{\text{POD}} \text{cromógeno} + H_2O$$

Los receptores cromogénicos que se emplean con mayor frecuencia es la orto_toluidina, el uso de este cromógeno está restringido ya que se considera cancerígeno, la fenol-4-aminofenazona, etc. Las longitudes de onda en que se mide la cuantificación de la glucosa depende del colorante empleado. (49)

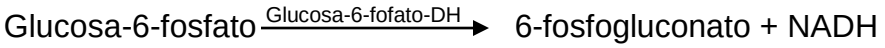
Método de la Hexoquinasa

Este es uno de los métodos más especificos para la cuantificación de la glucosa, al igual que el método de la glucosa oxidasa, consta de dos fase principales de reacción, en la reacción general se utilizan dos enzimas principales, la hexoquinasa y la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa. En la primera parte de la reacción la hexoquinasa transforma la glucosa en glucosa-6-fosfato y ADP en presencia de ATP y Mg. (49)

$$\text{Glucosa} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Hexoquinasa}} \text{Glucosa-6-fosfato} + \text{ADP}$$

La segunda parte de la reacción la glucosa-6-fosfato, la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, oxida a la glucosa-6-fosfato en presencia de NAD, produciendo

6-fosfogluconato y NADH. Por cada mol de glucosa presente en la reacción, se genera un mol de NAD y a su vez se convierte en un mol de NADH.




La cuantificación de la glucosa se realiza mediante la absorbancia del NADH a 340 y 383 nm.

### 2.3.3 LA ESPECTROFOTOMETRÍA

El método más usado e importante en la cuantificación del análisis químico es la espectrofotometría, la espectrofotometría es una técnica en donde se mide la cantidad de energía radiante que absorbe un sistema químico en función de la longitud de onda de la radiación. El espectrofotómetro es un instrumento de medición, el cual mide la concentración comparando la radiación absorbida o transmitida de una solución, la cual contiene una cantidad desconocida de soluto. (27)

La interacción de la radiación electromagnética con la materia es el principio fundamental de las técnicas espectroscópicas, esta interacción hace pasar las moléculas de un estado a otro estado energético distinto, en donde se absorbe una cantidad de energía radiante. (50)

LEY DE LAMBER-BEER

Cuando se hace pasar radiación monocromática sobre una muestra con una concentración “C” de una sustancia que absorberá a una longitud de onda, la intensidad de la radiación que la atraviesa, está relacionada con la intensidad que pasa sobre la muestra y por la densidad de la muestra, a este principio se le

conoce como la ley de Bourguer-Lambert-Beer o ley general de la espectrofotometría. (26)

Éste principio se puede representar en términos de potencia de luz, de donde se obtiene la siguiente fórmula:

$$^{It}/_{I0} = 10 - \varepsilon lc$$

La transmitancia se conoce como la relación $\mathrm{It/I0}$, por tanto la absobancia de una muestra se define como $\mathrm{A= \log\ (1/T)}$, éstas dos mediciones, transmitancia y absorbancia se miden en el equipo de espectrofotometría. Según las definiciones anteriores, queda plasmada la siguiente ley, conocida como ley de Lamber-Beer. (51)

$A = \varepsilon lc$ En donde:

A= la absorbancia

ε= absortividad molar

l= espesor de la celda

c= cocentracion molar

Una de las limitantes que tiene esta ley, es que no se puede aplicar a concentraciones muy elevadas. Por tanto, antes de comenzar la cuantificación de la concentración de la muestra, es pertinente comprobar experimentalmente el rango de concentración. (51)

# 3. CAPÍTULO III

## METODOLOGÍA DE LA VALIDACIÓN Y RESULTADOS

*"La mejor estructura no garantizará los resultados ni el rendimiento. Pero la estructura equivocada es una garantía de fracaso"*

*Peter Drucker.*

## 3.1 MATERIALES

En este capítulo realizaremos una explicación de los equipos y reactivos que se ocuparon para la validación del método. Básicamente la metodología que se empleó para este análisis fue el seguimiento de los puntos de la guía para la validación y verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio de análisis clínico, emitida por la entidad mexicana de acreditación (ema) y el Centro Nacional de Metrología (CENAM). Para el control del proceso se realizaron cartas control. Ver anexo A.

El instrumento de medición, en donde se realizó la validación fue el Dimensión XL, clinical chemistry system, el cual se encuentra en el área de química clínica del laboratorio de la Facultad, este realiza mediciones de diferentes analitos tales como: glucosa, colesterol, triglicéridos, ácido úrico, nitrógeno ureico, creatinina, entre otras.

A continuación se enlista los materiales y reactivos que se ocuparon en la realización de este trabajo.

Materiales:

- Dimensión XL, clinical chemistry system
- Pipeta graduada de 5 ml
- Micropipeta de 10 a 100 µl
- Micropipetas de 100 a 1000 µl
- Propipeta
- Termómetro de 0 a 100 °C
- Higrómetro ambient Weather
- Copas para suero o celdas
- Segmentos, propios del Dimensión XL
- Microtubos

Reactivos

- Reactivo para la glucosa, Flex® reagent cartridge Gluc, Marca SIEMENS
- Agua grado reactivo
- Calibradores, CHEM I, CAL, Marca SIEMENS
- Controles, DADE® Moni-Trol®

Para la realización de los cálculos estadísticos, se utilizó el Microsoft Office Excel 2007.

## 3.2 METODOLOGÍA

El presente trabajo de investigación tiene la característica de ser un método inductivo y deductivo, aun cuando por utilizar antecedentes de los valores, se puede considerar a este método, como un método retrospectivo y transversal que cubre con los aspectos que validan un conjunto de parámetros generales.

Para la realización de las mediciones en el equipo DIMENSION clinical chemistry system, primero se le realiza un mantenimiento diario, que consta de pruebas de agua y de aire, es importante comentar que el equipo, cuando está en funcionamiento frecuente, no se tiene que apagar por completo, al término del trabajo diario, éste solo se pone en pausa. Antes de evaluar todos los parámetros de la validación, el equipo en donde se realizarán las mediciones tiene que estar debidamente calibrado.

-Para la evaluación de la linealidad se realizaron diluciones de los calibradores, las diluciones que se analizaron fueron de cinco niveles de concentración, estos son 0%, 25%, 50%, 75% y 100%. Se utilizaron calibradores de concentración, M1=0 y

M2=537. Se realizaron cinco repeticiones de cada concentración las que se realizaron.

En la tabla 2 se expone la forma de la realización de las diluciones.

**TABLA 2. REALIZACIÓN DE LAS DILUCIONES**

| Número de dilución | Porción en volumen del la muestra 1 | Porción en volumen de la muestra 2 |
|---|---|---|
| 1 | Usar sin diluir | 0 |
| 2 | 3 | 1 |
| 3 | 2 | 2 |
| 4 | 1 | 3 |
| 5 | 0 | Usar sin diluir |

Después de realizadas las diluciones se llevan a la cuantificación en el equipo DIMENSION, los resultados obtenidos servirán para la evaluación de la linealidad.

-Para la evaluación de la precisión se realizaron diferentes mediciones en el mismo aparato. Se cuantificó la glucosa de los controles de calidad internos. Para esto se realizaron veinte mediciones del analito glucosa, durante veinticuatro horas, con los resultados obtenidos, se verificó el desempeño de la precisión.

Los sueros del control de calidad interno, se encuentran a temperaturas de congelación para mantener por mayor tiempo su estabilidad, en el comienzo de este proceso de análisis, los controles se atemperan, se registra en el equipo y se lleva a la cuantificación. Este es el proceso general de la realización de todas las veinte mediciones durante las 24 horas.

-La evaluación de los parámetros restantes, se realizaron con los mismos datos arrojados de este mismo proceso de medición.

En el siguiente tema se realiza el análisis de cada uno de los resultados obtenidos.

## 3.3 RESULTADOS

En este capítulo se plasman los resultados obtenidos en el proceso de la validación, empezamos por evaluar la linealidad del método.

### 3.3.1 LINEALIDAD

Para la linealidad del método se realizaron cinco diluciones a cinco niveles de concentración, de cada uno se realizaron cinco mediciones, los datos arrojados por el equipo se muestran a continuación:

**TABLA 3. DATOS DE LAS MEDICIONES DE LAS DILUCIONES**

| Dilución | Mediciones de la concentración de la glucosa en mg/dL | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 521 | 516 | 521 | 525 | 516 |
| 2 | 392 | 392 | 391 | 392 | 392 |
| 3 | 271 | 271 | 268 | 269 | 267 |
| 4 | 137 | 135 | 131 | 128 | 128 |
| 5 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 |

Después de obtener las mediciones del equipo, utilizando el método de mínimos cuadrados se realiza una gráfica de linealidad, se graficó en el eje de las “X” los

valores asignados a los calibradores y en eje de las “Y” los valores de las medias de los datos arrojados por el equipo.

**TABLA 4. PARA EL GRÁFICO DE LA LINEALIDAD**

| Eje x, valor asignado a los calibradores (mg/dL) | Eje y, valor de las medias, datos arrojados por el equipo (mg/dL) |
|---|---|
| 0 | 0.6 |
| 135 | 131.8 |
| 270 | 269.2 |
| 405 | 391.8 |
| 540 | 519.8 |

La gráfica obtenida de la linealidad para glucosa es la siguiente.

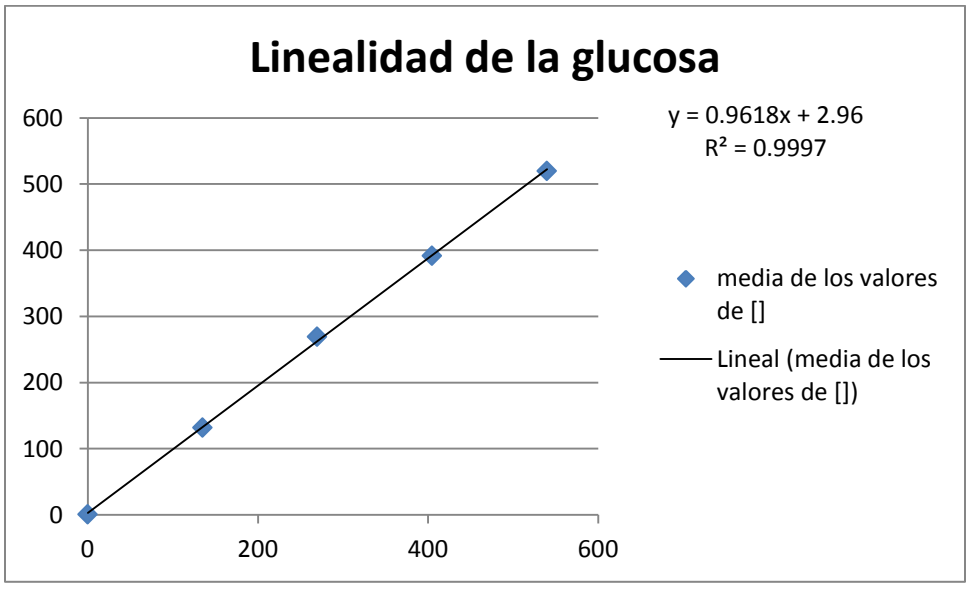



**ILUSTRACIÓN 7. LINEALIDAD DE LA GLUCOSA**

El valor de $R^2=0.999$, indica que la función de calibración es lineal en el intervalo evaluado. Sin embargo para poder validar este intervalo, se ocupa saber los porcentajes de errores, así como también su desviación o sesgo.

Para el cálculo del sesgo se resta la media de los valores arrojados por el equipo y el valor de concentración conocida de las diluciones de cada calibrador, esto es:

*valor de las medias datos arrojados por el equipo (mg/dL) - valor asignado a los calibradores (mg/dL).*

Para calcular el porcentaje de error, basta con dividir el sesgo obtenido entre la media de los valores, de los datos arrojados por el equipo y multiplicarlo por 100, esto es:

$$\frac{sesgo\ (desviación)}{media\ de\ los\ valores} \times 100$$

la siguiente tabla muestra el sesgo y el porcentaje de error de cada una de las mediciones obtenidas:

**TABLA 5. PORCENTAJE DE ERROR**

| Número de dilución | Media de los valores | Valor teórico de los calibradores | Sesgo | % Error |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 0.6 | 0 | 0.6 | - |
| 2 | 131.8 | 135 | 3.2 | 2.37 |
| 3 | 269.2 | 270 | 0.8 | 0.30 |
| 4 | 391.8 | 405 | 13.2 | 3.26 |
| 5 | 519.8 | 540 | 20.2 | 3.74 |

Los datos de la linealidad del método, el fabricante de los reactivos no los informa. Por tanto este parámetro de la validación, no se puede comparar, sin embargo se

llevó a cabo con éxito todo el proceso para la validación del parámetro de la linealidad.

### 3.3.3 PRECISIÓN

A continuación se mostrarán los resultados obtenidos para la validación del parámetro de la precisión, para este parámetro de desempeño, se realizaron 20 mediciones en 24 horas, se utilizó como muestra problema los sueros de los controles de calidad, nivel 1 (control 1) y nivel 2 (control 2) Los datos de estas mediciones se muestran en la tabla 6 .

**TABLA 6 MEDICIONES DE LAS 24 HORAS**

| MEDICIÓN | GLUC (mg/dl) nivel 1 | MEDICIÓN | GLUC ( mg/dl) nivel 2 |
|---|---|---|---|
| 1 | 224 | 1 | 78 |
| 2 | 224 | 2 | 78 |
| 3 | 227 | 3 | 78 |
| 4 | 226 | 4 | 79 |
| 5 | 229 | 5 | 79 |
| 6 | 225 | 6 | 79 |
| 7 | 223 | 7 | 75 |
| 8 | 221 | 8 | 75 |
| 9 | 222 | 9 | 80 |
| 10 | 223 | 10 | 76 |
| 11 | 222 | 11 | 75 |
| 12 | 223 | 12 | 76 |
| 13 | 223 | 13 | 76 |
| 14 | 224 | 14 | 76 |
| 15 | 227 | 15 | 76 |

| | |
|---|---|
| 16 | 224 |
| 17 | 227 |
| 18 | 225 |
| 19 | 225 |
| 20 | 228 |

| | |
|---|---|
| 16 | 76 |
| 17 | 77 |
| 18 | 78 |
| 19 | 78 |
| 20 | 78 |

Se realizó el cálculo de la media la desviación estándar y el coeficiente de variación, este último está expresado en porcentaje.

**TABLA 7. PROMEDIO, DESVACIÓN ESTANDAR Y COEFICIENTE DE VARIACIÓN NIVEL 1**

| | |
|---|---|
| PROMEDIO mg/dl | 224.6 |
| SD | 2.16 |
| CV % | 0.0096 |

**TABLA 8. PROMEDIO, DESVIACIÓN ESTANDAR Y COEFICIENTE DE VARIACIÓN NIVEL 2**

| | |
|---|---|
| PROMEDIO mg/dl | 77.15 |
| SD | 1.53 |
| CV % | 1.98 |

Los resultados obtenidos del fabricante son los siguientes.

| | Promedio mg/dl | SD | % CV |
|---|---|---|---|
| Nivel 1 | 55 | 0.6 | 0.9 |
| Nivel 2 | 118 | 0.6 | 1.4 |

Se puede observar en la comparación de resultados, que los valores de la SD y el CV del fabricante están por debajo que los valores reportados por el LAC-QFB, esto porque la utilización de los controles fue diferente. El control utilizado en el

lab-QFB fue el DADE® Moni-trol®, mientras que el control utilizado por el fabricante fue control suero BioRad® Multiqual ®.

### 3.3.4 VERACIDAD

Para el cálculo de la veracidad se tomaron en cuenta los valores del nivel 1. La guía para la validación y verificación de los procedimientos de examen, indica tres puntos de cómo realizar el cálculo de la veracidad, estos son:

- Valoración de un material de referencia certificado
  a) Valoración por el cálculo relativo
  b) Valoración por el cálculo de porcentaje de recuperación
- Estudios de comparación de métodos
- Estudios de comparación interlaboratorios con base en los resultados de programas de ensayos de aptitud.

En este caso para la realización de este parámetro se tomó en cuenta el primer punto en sus dos incisos.

**-VALORACIÓN POR EL CÁLCULO RELATIVO**

En este cálculo los datos que se obtuvieron de las mediciones de 24 horas, son con los que realizaremos el cálculo

La siguiente fórmula nos expresa el cálculo del % de error relativo:

$$\%\ de\ error\ relativo = [\frac{(valor\ real - valor\ de\ la\ medicion)}{valor\ real}]X\ 100$$

- El valor asignado o real del control de calidad que se metió en las mediciones es de: 242 mg/dl

-la media o el valor de las mediciones fue de: 224.6 mg/dl

-aplicando la fórmula del error relativo tenemos:

$$\%\ de\ error\ relativo = \frac{(242\ mg/dl - 224.6\ mg/dl)}{242\ mg/dl} X100$$

$$\%\ de\ eror\ relativo = 7.19$$

Para el criterio de aceptación de esta prueba, según la guía, dice que tiene que ser igual o menor que el que reporta el fabricante del equipo, al igual que la mayoría de los parámetros de validación, el fabricante no informó este parámetro.

## -VALORACIÓN POR EL CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN

La fórmula que representa el cálculo del porcentaje de recuperación es la que se muestra a continuación:

$$\%\ de\ recuperación = \frac{valor\ obtenido}{valor\ de\ referencia} X100$$

Los valores que se tienen para este cálculo son los mismos que para el cálculo del porcentaje de error relativo, luego entonces:

-valor asignado o de referencia= 242 mg/dl

-media o valor obtenido= 224.6 mg/dl

Por tanto tenemos:

$$\%\ de\ recuperación = \frac{224.6 \frac{mg}{dl}}{242 \frac{mg}{dl}} X\ 100$$

$$\%\ de\ recuperación = 92.80$$

Los valores de recuperación deben estar cercanos a 100, entre más cercano a 100 mayor porcentaje de recuperación, resultados menores indican cantidades menores de recuperación del analito.

El criterio de aceptación es que el resultado debe ser menor o igual al reportado por el fabricante, el % de recuperación no está informado en los insertos de los reactivos.

### 3.3.5 SENSIBILIDAD

El siguiente parámetro a calcular es la sensibilidad, ésta se calcula con la siguiente fórmula:

$$y = \frac{b}{S_m}$$

En donde:

y = sensibilidad.

b = pendiente obtenida desde la regresión lineal del analito.

$S_m$ = desviación estándar de la muestra.

-El valor de la pendiente, se obtiene con el cálculo de la gráfica de la línea recta, el valor obtenido fue: 0.961

-para el valor de la deviación estándar, se toma la desviación estándar obtenida de las mediciones del analito. Esta fue: 1.79

-aplicando la fórmula para la sensibilidad tenemos que:

$$y = \frac{0.961}{1.79}$$

Por lo tanto el valor es igual a y=0.53, este valor indica la sensibilidad del método de detectar pequeñas variaciones de la concentración del analito.

### 3.3.6 LÍMITE DE DETECCIÓN

Para los límites de detección y de cuantificación, se realizaron mediciones con muestras de blancos de agua, fueron cinco mediciones las que se realizaron.

Los resultados arrojados por el equipo son los siguientes.

**TABLA 9. VALORES DE LOS BLANCOS**

| Mediciones de los blancos para glucosa mg/dl |
|---|
| 0 |
| 0 |
| 1 |
| 0 |
| 0 |

De estos resultados sacaremos la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación estos valores son:

Media= 0.36

Desviación estándar= 0.19

CV= 53.00

La fórmula utilizada para el caculo del límite de detección es la siguiente.

$$LD = \frac{Ybl + 3 * Sbl}{b}$$

En donde:

Ybl = señal promedio del blanco.

Sbl = desviación promedio del blanco.

b= pendiente obtenida desde la regresión lineal del analito.

Sustituyendo los valores en la fórmula tenemos que:

$$LD = \frac{0.36 + 3 * 0.191}{0.961}$$

$$LD = 0.30\, mg/dl$$

El límite de detección es la mínima concentración de un analito que se puede detectar con certeza, sin embargo esta no puede ser necesariamente cuantificada.

### 3.3.7 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Las mismas mediciones de los blancos son las que se utilizarán para la determinación del parámetro del límite de cuantificación.

La fórmula para determinar el límite de cuantificación es:

$$LC = \frac{Ybl + 10 * Sbl}{b}$$

Sustituyendo los valores en la fórmula:

$$LC = \frac{0.36 + 10 * 0.191}{0.961}$$

Por tanto:

$$LC = 0.74\, mg/dl$$

El límite de cuantificación indica la mínima cantidad de analito que se puede determinar en términos de precisión y exactitud razonables, esta se expresa en unidades de concentraciones.

# CAPÍTULO IV

*"Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber"*

*Albert Einstein.*

# CONCLUSIONES

El funcionamiento de un laboratorio de análisis clínicos es de suma importancia, ya que sus resultados emitidos pueden ser factor determinante para el diagnóstico de las enfermedades, por tanto, los resultados emitidos deben de ser altamente confiables. Para obtener esta confiabilidad, los métodos utilizados por los laboratorios deberían de estar debidamente validados. Con este trabajo de investigación se dio un paso para la validación del método empleado para la cuantificación del analito de la glucosa.

Para realizar la validación del método en el laboratorio de análisis clínicos de la Facultad de Químico Farmacobiología, se utilizó la metodología empleada por la guía para la validación y verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico, emitida por ema.

Se obtuvieron resultados para los parámetros de linealidad, precisión, veracidad, límite de detección, límite de cuantificación, sensibilidad analítica, sin embargo el criterio que pide la entidad mexicana de acreditación, mediante la guía de validación, indica hacer un comparativo de cada uno de los resultados de los parámetros obtenidos en el laboratorio con los resultado informados por el fabricante en sus insertos. No obstante, el fabricante de los reactivos se limita a informar sus resultados de los parámetros de desempeño del método empleado, sin que reporten todos los parámetros de desempeño. Pese a esa omisión, se realizó la obtención de los parámetros solicitados, sin embargo sería conveniente obtener la documentación de los parámetros de análisis inicial o a obtención de un equipo que de manera rutinaria pueda ser presentado para una comparación con fines de validación e inclusive someterse a calificaciones de equipos e instrumentos de medición analítica (CEIMA), sugeridos por organismos como el Centro Nacional de Metrología.

# TRABAJO A FUTURO

En este capítulo se dará una perspectiva de la continuación de este trabajo, complementándolo con otras investigaciones referentes a validaciones.

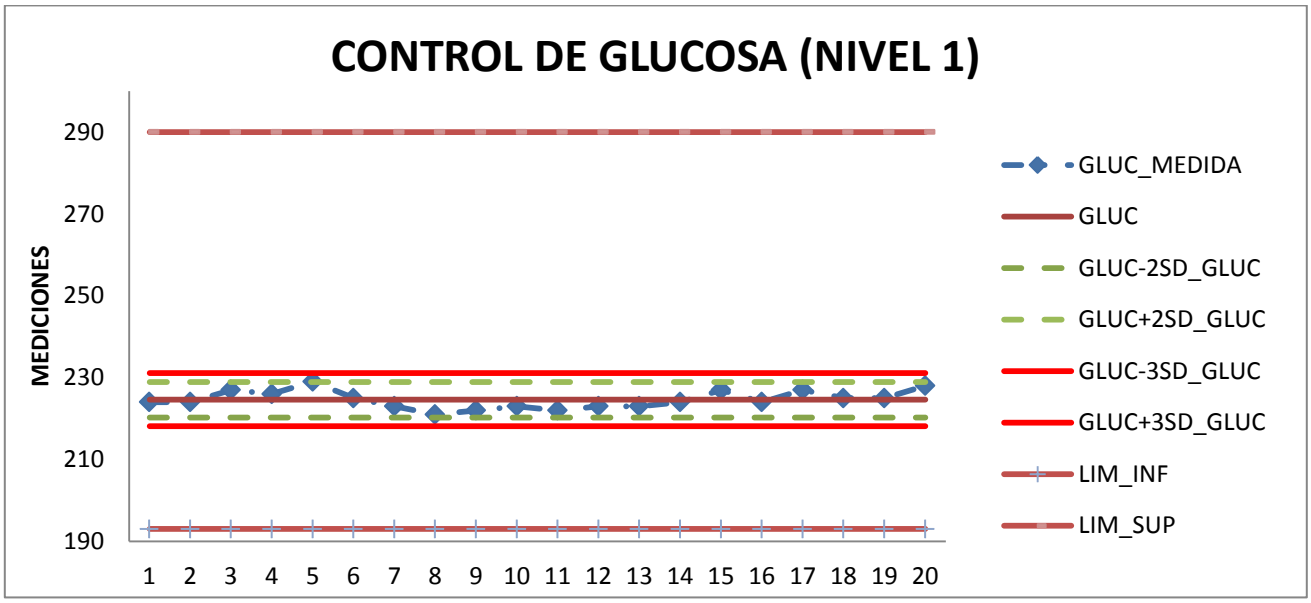
Uno de muchos de los criterios que la Entidad Mexicana de Acreditación pide para que un laboratorio pueda ser acreditado, es la presentación de evidencias objetivas de que los métodos utilizados en dichos laboratorios estén debidamente validados. El objetivo principal del laboratorio de análisis clínicos es hacerse acreedor de la acreditación emitida por EMA. Existen muchos otros métodos del cual el laboratorio hace uso de ellos, este trabajo de investigación hace una pauta para que en el futuro otros métodos puedan ser validados y así contar con la mayoría de métodos validados, proporcionando así al cliente la confiabilidad que se merece.

# ANEXOS

**ANEXO A**

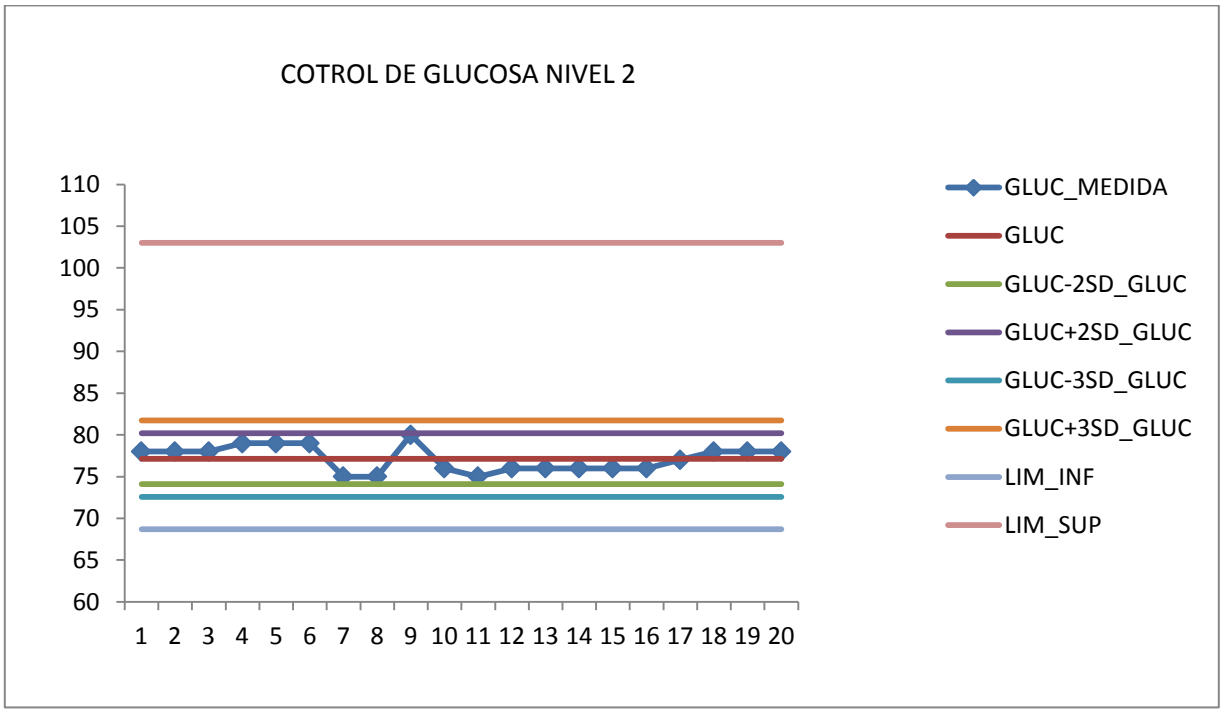
Para llevar el control de todo el proceso de las mediciones, se realizaron cartas control. A continuación se muestran los gráficos obtenidos.

| GLUC | GLUC-2SD_GLUC | GLUC+ 2SD_GLUC | GLUC- 3SD_GLUC | GLUC+3SD_GLUC | LIM_INF | LIM_SUP |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 224.60 | 220.3 | 228.9 | 218.1 | 231.1 | 193 | 290 |
| 224.60 | 220.3 | 228.9 | 218.1 | 231.1 | 193 | 290 |
| 224.60 | 220.3 | 228.9 | 218.1 | 231.1 | 193 | 290 |
| 224.60 | 220.3 | 228.9 | 218.1 | 231.1 | 193 | 290 |
| 224.60 | 220.3 | 228.9 | 218.1 | 231.1 | 193 | 290 |
| 224.60 | 220.3 | 228.9 | 218.1 | 231.1 | 193 | 290 |
| 224.60 | 220.3 | 228.9 | 218.1 | 231.1 | 193 | 290 |
| 224.60 | 220.3 | 228.9 | 218.1 | 231.1 | 193 | 290 |
| 224.60 | 220.3 | 228.9 | 218.1 | 231.1 | 193 | 290 |
| 224.60 | 220.3 | 228.9 | 218.1 | 231.1 | 193 | 290 |
| 224.60 | 220.3 | 228.9 | 218.1 | 231.1 | 193 | 290 |
| 224.60 | 220.3 | 228.9 | 218.1 | 231.1 | 193 | 290 |
| 224.60 | 220.3 | 228.9 | 218.1 | 231.1 | 193 | 290 |
| 224.60 | 220.3 | 228.9 | 218.1 | 231.1 | 193 | 290 |
| 224.60 | 220.3 | 228.9 | 218.1 | 231.1 | 193 | 290 |
| 224.60 | 220.3 | 228.9 | 218.1 | 231.1 | 193 | 290 |
| 224.60 | 220.3 | 228.9 | 218.1 | 231.1 | 193 | 290 |
| 224.60 | 220.3 | 228.9 | 218.1 | 231.1 | 193 | 290 |
| 224.60 | 220.3 | 228.9 | 218.1 | 231.1 | 193 | 290 |
| 224.60 | 220.3 | 228.9 | 218.1 | 231.1 | 193 | 290 |
| 224.60 | 220.3 | 228.9 | 218.1 | 231.1 | 193 | 290 |
| 224.60 | 220.3 | 228.9 | 218.1 | 231.1 | 193 | 290 |




Para el control 2 se obtuvieron los siguientes datos.

| GLUC | GLUC-2SD_GLUC | GLUC+2SD_GLUC | GLUC-3SD_GLUC | GLUC+3SD_GLUC | LIM_INF | LIM_SUP |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 77.15 | 74.1 | 80.2 | 72.6 | 81.7 | 68.7 | 103 |
| 77.15 | 74.1 | 80.2 | 72.6 | 81.7 | 68.7 | 103 |
| 77.15 | 74.1 | 80.2 | 72.6 | 81.7 | 68.7 | 103 |
| 77.15 | 74.1 | 80.2 | 72.6 | 81.7 | 68.7 | 103 |
| 77.15 | 74.1 | 80.2 | 72.6 | 81.7 | 68.7 | 103 |
| 77.15 | 74.1 | 80.2 | 72.6 | 81.7 | 68.7 | 103 |
| 77.15 | 74.1 | 80.2 | 72.6 | 81.7 | 68.7 | 103 |
| 77.15 | 74.1 | 80.2 | 72.6 | 81.7 | 68.7 | 103 |
| 77.15 | 74.1 | 80.2 | 72.6 | 81.7 | 68.7 | 103 |
| 77.15 | 74.1 | 80.2 | 72.6 | 81.7 | 68.7 | 103 |
| 77.15 | 74.1 | 80.2 | 72.6 | 81.7 | 68.7 | 103 |
| 77.15 | 74.1 | 80.2 | 72.6 | 81.7 | 68.7 | 103 |
| 77.15 | 74.1 | 80.2 | 72.6 | 81.7 | 68.7 | 103 |
| 77.15 | 74.1 | 80.2 | 72.6 | 81.7 | 68.7 | 103 |
| 77.15 | 74.1 | 80.2 | 72.6 | 81.7 | 68.7 | 103 |
| 77.15 | 74.1 | 80.2 | 72.6 | 81.7 | 68.7 | 103 |
| 77.15 | 74.1 | 80.2 | 72.6 | 81.7 | 68.7 | 103 |
| 77.15 | 74.1 | 80.2 | 72.6 | 81.7 | 68.7 | 103 |
| 77.15 | 74.1 | 80.2 | 72.6 | 81.7 | 68.7 | 103 |
| 77.15 | 74.1 | 80.2 | 72.6 | 81.7 | 68.7 | 103 |
| 77.15 | 74.1 | 80.2 | 72.6 | 81.7 | 68.7 | 103 |
| 77.15 | 74.1 | 80.2 | 72.6 | 81.7 | 68.7 | 103 |
| 77.15 | 74.1 | 80.2 | 72.6 | 81.7 | 68.7 | 103 |
| 77.15 | 74.1 | 80.2 | 72.6 | 81.7 | 68.7 | 103 |
| 77.15 | 74.1 | 80.2 | 72.6 | 81.7 | 68.7 | 103 |


COTROL DE GLUCOSA NIVEL 2
110
105
100
95
90
85
80
75
70
65
60
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
GLUC_MEDIDA
GLUC
GLUC-2SD_GLUC
GLUC+2SD_GLUC
GLUC-3SD_GLUC
GLUC+3SD_GLUC
LIM_INF
LIM_SUP

# GLOSARIO

**Adecuado al propósito**:

Grado en el que los datos resultantes de un proceso de medición le permiten al usuario tomar decisiones técnica administrativamente correctas para el propósito establecido.

**Ámbito lineal**

Es la parte de la función de calibración en la que la señal obtenida para el analito responde "linealmente" a la concentración. Se verifica mediante la obtención de un coeficiente de correlación mayor o igual a 0.995. (Metrología en el laboratorio clínico).

**Analito**

Especie de interés a determinar en un análisis.

**Calibración**

conjunto de operaciones que establecen, en condiciones específicas, la relación entre los valores de las magnitudes indicadas por un instrumento de medición o un sistema de medición, o los valores representados por una medida materializada o un material de referencia, y los valores correspondientes de la magnitud realzada por los patrones.

**Corrida**

Conjunto de muestras analizadas en forma continua, bajo las mismas condiciones experimentales.

**Desviación/sesgo**

Error sistemático de un proceso de medición.

**Ensayo/prueba**

Determinación de una o más características de acuerdo con un procedimiento.

**Especificidad**

Es la capacidad de determinar el analito inequívocamente en la presencia de componentes los cuales se espera que estén presentes. Comúnmente puede incluir impurezas, degradantes, matriz, etc.

**Evidencia objetiva**

Datos que respaldan la existencia o veracidad de algo.

**Exactitud de medición**

Grado de la concordancia entre el resultado de una medición y el valor verdadero (o real) de lo medido (el mensurando).

**Exactitud relativa**

Grado de concordancia entre los resultados del método evaluado y los obtenidos utilizando un método de referencia conocido.

**Incertidumbre de medición**

Parámetro asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente, ser atribuidos al mensurando.

**Intervalo de trabajo**

Intervalo de las concentraciones analíticas o los valores de las propiedades sobre las cuales el método va a ser aplicado. Entro del intervalo de trabajo puede existir un intervalo de respuesta lineal, en el que, la señal de respuesta sistema de medición tendrá una relación lineal con la concentración del analito o el valor de la propiedad.

**Límite de cuantificación**

Es aquel valor de concentración mínimo que puede obtenerse con una imprecisión aceptable.

**Límite de detección**

Concentración mínima de un analito en la matriz de una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo condiciones analíticas específicas.

**Linealidad**

La capacidad (dentro de un intervalo dado) para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en el que la respuesta del sistema de medición es una función lineal de la concentración del analito en las muestras de examen.

El termino linealidad aplicado a un método analítico, se refiere al tramo de concentraciones del analito en el que la respuesta del sistema de medición es una función lineal de la concentración; la representación gráfica de este tramo (concentraciones frente a respuestas) debe exhibir una buena correlación de los puntos experimentales a la recta de regresión para que el método analítico en cuestión sea aceptable.

**Magnitud**

Atributo de un fenómeno, de un cuerpo o de una sustancia, que es susceptible de distinguirse cualitativamente y de determinarse cuantitativamente.

# BIBLIOGRAFÍA

1. **Cento Nacional de Metrologia.** *Metodos analíticos decuados a su propósito.* Qro. México : s.n., noviembre, 2005. CNM-MRD-PT.030.

2. **Encuesta Nacional de Salud y Nutrición.** *Diabete mellitus: la rgencia de reforzar la respuesta en politicas publicas para su prevencion y control.* Mexico : s.n., 2012. http://ensanut.insp.mx/doctos/analiticos/DiabetesMellitus.pdf.

3. **Oganizacion Mundial de la Salud.** *diabetes.* centro de prensa. septiembre de 2012. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/.

4. **PALLARDO, luis felipe [et, al].** *endocrinologia clinica.* españa : Diaz de Santos, 2010. 978-84-7978-930-5.

5. **TEBÁR, francisco javier y, ESCOAR fernando.** *La diabetes mellitus en la practica clinica.* Madrid España : panamericana, 2009. 978-84-7903-450-4.

6. **Escobar, Jimenez, Fernando y Tébar, Massó Francisco Javier.** *La diabetes Mellitu en la Practica Clinica.* Buenos Aires, Madrid : Panamericana, 2009. 978-84-7903430-4.

7. *VALIDACION Y VERIFICACION DE METODOS CUANTITATIVOS.* **Quitana, Sandra.** México : s.n., Octubre, 2010.

8. **Red Nacional de Metrología de chile.** *Siema Metrologico Internacional.* Chile : s.n., 2011. http://www.metrologia.cl/link.cgi/Metrologia/315.

9. **Bureau International des Poids et Mesures.** *La Convention du Metre.* Paris : s.n. http://www.bipm.org/fr/convention/.

10. **Bureau International des Poisd et mesures.** *la commision internationale du metre (1870-1872).* Paris : s.n., 2013. http://www.bipm.org/fr/si/history-si/commission.html.

11. **J Martincic, Cynthia.** *A Brief History of ISO.* Pittburgh : s.n., 1997. http://www.sis.pitt.edu/~mbsclass/standards/martincic/isohistr.htm.

12. **Lopez, Bartolomé.** *Evolucion Histórica, Normas, DIN e ISO.* Dibujo Tecnico.com. España : s.n., 2000.

13. **NORM APME.** *¿Qué son las normas?* 2011. http://www.normapme.eu/es/page/194/que-son-las-normas.

14. **René, Dybkaer.** *Acreditación de los laboratorios clínicosmediante la norma ISO 15189:2003.* Frederiksberg, Dinamarca : Diagnostico in vitro, 2003.

15. **Entidad Mexicana de Acreditacion.** *Acreditacion.* Mexico, DF : s.n. http://www.ema.org.mx/portal/index.php/Acreditacion/beneficios.html.

16. **Entidad Nacional de Acreditación.** *PLAN DE TRANSICIÓN A UNE-EN ISO 15189:2013 EN LOS LABORATORIOS CLÍNICOS.* julio 2013. http://www.enac.es/documents/7020/801177aa-7c6f-4ee0-b4ff-dfeebb15c52b.

17. **Cummings, Tucker.** *he Hystiru of Glucose.* 1999. http://www.ehowenespanol.com/.

18. **D´ Adamo, Piter.** *Glucomics.* 2006. http://www.drpeterjdadamo.com/wiki/wiki.pl/Carbohydrate.

19. *Historia de la diabetes.* **Sancez, Germán.** 2, Cochabamba : Gaceta medica bolviana, 2007, Vol. 30. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S1012-29662007000200016&script=sci_arttext. 1012-2966.

20. *Soporte Social en adultos diabeticos no insulinodeendientes que perteecen a un clup de apoyo para el adulto diabetico.* **Garcia, Andrea Lucia.** Perú : s.n., 2013.

21. *Breve historia de lo inicios de la medicion de la glucosa.* **Mirez, Jorge Luis.** Perú : s.n., 2011.

22. **Presiencia Constituional de losEstados Unidos Mexicanos.** *Ley Federal sobre metrología y normalizacion.* México : s.n., 2012.

23. **Instituto Mexicano de Nomalización y Certificación A. C.** *NORMA MEXICANA IMNC. Laboratorios Clínicos- Requisitos Particulares para la calidad y la competencia.* México : IMNC, 2008.

24. **Barlandas, Nicolas Rogelio Erick y [et, al].** *Guia para la validcion y la verificacion de los procedimienos de exame cuantitativos empleados por el boratorio cinico.* Mexico : s.n., Abril, 2008.

25. **Entidad Mexicana de Acreditacion.** *Lisado de Laboratorios clinicos acreditados.* México : s.n., 2013.

26. *Validación del sistema de diluciones de un filro solar físico de dioxido de titanio.* **Color, Victor Manuel.** Morela, Michoacán, México : s.n., 2010.

27. *Validacion del método de espectofotometria infrarroja para la identificacion de drogas de abuso en el Laboratorio Químico del área forence.* **Rangel, Ana Rosa.** Morelia, Michoacán : s.n., septiembre, 2010.

28. *Validacion e implementación de una metodología para el análisis microbiologico de un producto líquido preservado, elaborado en una industria farmaceutica.* **Ortiz, Diana sofia.** Bogotá : s.n., enero, 2008.

29. **Agencia Española de medicamentos y productos sanitarios.** *Guías de Normas de Correcta Fabricacion de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario.* Madrid, España : s.n., septiembre, 2001.

30. **Rossel, Augusto.** Aprueban Guía para la validación de métodos de ensayo y las directrices ara la implementación y evaluacion de métodos de enayos sensoriales. *El Peruano.* 16 de enero de 2003.

31. **Entidad costarricense de Acreditación.** *Poliica de validacion de métodos.* Costa Rica : s.n., 2012.

32. **the medical biochemistry page.** *Introduccion a los carbohidratos.* 2013. http://themedicalbiochemistrypage.org/es/carbohydrates-sp.php.

33. **Suardíaz, Jorge, Cruz, Celso y Colina, Ariel.** *Laboratorio Clínico.* Habana : Editorial Ciencias Medicas, 2004. http://www.slideshare.net/mpaternina/laboratorio-clinico-y-pruebas-diagnosticas-17737695. 959-212-120-6.

34. **Amando, Garrido, Pertierra.** *Bioquimica Metabólica, conseptos y test.* s.l. : Tébar, 2001. 84-95447-29-0.

35. **Viru, Atko y Mehis, Atko.** *ANÁLISIS Y CONTROL DEL RENDIIENTO DEPORTIVO.* Barcelona : PAIDOTRIBO, 2001. 84-8019-718-8.

36. **Facultad de Ciencas Exactas, Fisicas y Naturales de la Universidad Nacional de Cordoba.** *Glucólisis.* Córdoba, Argentina : s.n., 2010.

37. **Leal, Pacheco.** *Bioquimica Medica.* México : Limusa, 2004. 968-18-6468-9.

38. *Adrenalina Droga Natural.* **Ojo Cientifico.com.** 2011. http://www.ojocientifico.com/2011/11/21/adrenalina-droga-natural.

39. **International Diabetes Federation.** *Mortalidad.* 2011. http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/es/mortalidad.

40. **Aguirre, Botello, Manuel.** *México Prncipales Causas de Mortalidad desde 1938.* México : s.n., Mayo, 2011. http://www.mexicomaxico.org/Voto/MortalidadCausas.htm.

41. *¿Que causa la Diabetes?* **Anania, Mandal.** Bogotá, Colombia : s.n., 2010. http://www.news-medical.net/health/What-Causes-Diabetes-(Spanish).aspx.

42. **Lopez, chicharro, José y Lopez, Mojarez, Luis Miguel.** *Fisiología clínica del ejercicio.* Buens Aires; Madrid : Panamericana, 2008. 978-84-9835-167-5.

43. **UNIVERSITY of MARY LAND MEDICAL CENTER.** *Diabetes tipo 1.* junio 2013. http://umm.edu/health/medical/reports/articles/diabetes-type-1.

44. **Debra, Manzella, RN.** *¿QUE ES LA DIABETES?* 2010. http://diabetes.about.com/od/whatisdiabetes/p/whatisdiabetes.htm.

45. **Nieves, Martell, Claros. [et al].** *Perception of health and understanding.* Madrid Spain : SAGE, 2011. http://cpr.sagepub.com/content/20/1/21.full.pdf+html.

46. **FUNDACION MAYO PARA LA EDUCACION E INVESTIGACON MEDICA.** MAYO CLINIC. *MAYO CLINIC.* [En línea] 24 de MARZO de 2011. http://www.mayoclinic.com/health/gestational-diabetes/DS00316.

47. **Antuña de Alaiz, Ramiro.** Cínica Diabetológica. *Cínica Diabetológica.* [En línea] 2013. http://www.clinidiabet.com/es/infodiabetes/educacion/miscelanea/17.htm.

48. **Rojas, Carrera, Sonia Irma, y otros.** *Precicion Diagnostica de la Prueba O´Sullivan en diabetes gestacional.* Veracruz, Veracruz, México : s.n., 2013. http://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2013/im133s.pdf.

49. **J, Diaz, Portillo, MT, Fernandez, Del Barrio y F, Parede Salido.** *Aspetos Básicos de Bioquímica Clínica.* Madrid, Espana : Diaz de Santos, 2003. 84-7978-282-x.

50. **Direccion Nacional de Innovacion Académica.** *Espectrofotometria.* Bogotá, Colombia : s.n. http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2001184/lecciones/Cap05/05_01_01.htm.

51. **Ruiz, Soriano, Juan.** *Problemas de Laboratorio clinico y Farmacéutico.* Barcelona, España : ELSEVIER, 2009. 978-84-8086-339-1.

52. **Pan American Health Organization.** *causas principales de mortalidad en las americas.* EUA : s.n., 2010. http://ais.paho.org/phip/viz/mort_causasprincipales_lt_oms.asp.

53. **Infante Ramirez, Lilia.** *Control de calidad en equipos.* BIO-RAD. México : s.n., 2009.

54. **Pan American Health Organization.** *Causas principales de mortalidad en las Americas.* 2012.