

2014

**FEBRERO A
NOVIEMBRE**

 **iberolab**

**VII CONGRESO VIRTUAL IBEROAMERICANO
SOBRE GESTIÓN DE CALIDAD EN LABORATORIOS**

www.iberolab.org

ESPAÑA



GOBIERNO DE ESPAÑA

MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE



Generalitat de Catalunya
Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural



Agencia de Gestión Agraria y Pesquera de Andalucía
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL



INSTITUTO TECNOLÓGICO AGRARIO

Junta de Castilla y León
Consejería de Agricultura y Ganadería

ARGENTINA

SECRETARÍA EN IBEROAMÉRICA



Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria



Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca
Presidencia de la Nación



Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

MÉXICO

DELEGACIÓN EN IBEROAMÉRICA

PROCEDIMIENTO PARA LA CALIBRACIÓN Y VERIFICACIÓN DE I.V.A.P.

M.A. Gastaminza Nuin¹, I. Saiz Martín¹, M. Eguaras Goñi¹, M. Izu Arbeloa¹ y J.A. Perez de Ciriza Marco¹

¹ Sección de Laboratorio de Salud Pública, Instituto de Salud Pública y Laboral de Navarra, c/ Leyre, 15, CP 31003. Pamplona, España. Emails: mgastamn@navarra.es

ÁREA TEMÁTICA: Requisitos Técnicos

RESUMEN. En este trabajo se propone una sistemática para la realización de las actividades de calibración y verificación de los I.V.A.P. (aparatos volumétricos accionados mediante pistón) de forma que se realicen de manera normalizada, se asegure la trazabilidad de los resultados y permita demostrar periódicamente que los instrumentos de medida se encuentran en perfecto estado.

PALABRAS CLAVE. I.V.A.P., Sistemática, Calibración, Verificación.

1. Introducción

Los procesos de verificación y calibración proporcionan un medio para comprobar si las desviaciones individuales obtenidas para un instrumento y los valores conocidos de una magnitud medida, son menores que el máximo error permitido, definido en una norma, reglamento o especificación particular.

Los resultados de estas operaciones proporcionan la base para aceptar los resultados o tomar una decisión, ya sea la de poner el equipo de nuevo en uso, realizar ajustes, repararlo, ponerlo fuera de uso o, si es el caso, darlo de baja definitiva.

2. Generalidades

Cada equipo debe ser calibrado/verificado al menos a un volumen, según su uso y los volúmenes utilizados frecuentemente.

Para realizar la verificación/calibración se requiere agua destilada, un recipiente de pesada, un termómetro verificado, un barómetro calibrado y una balanza analítica calibrada. El material, incluido el equipo a calibrar, deberá estabilizarse al menos dos horas a temperatura ambiente. Además dicha temperatura deberá ser registrada y considerada al efectuar los cálculos y establecer los correspondientes factores de corrección.

En las pipetas para uso en actividad de Química, se recomienda humectar la punta aspirando y expulsando el líquido 2 o 3 veces de manera que se mejore la precisión y exactitud de los resultados compensando las propiedades del líquido, ya que los líquidos humectantes forman una fina pared en el interior de la punta y como consecuencia se dispensaría un volumen inferior. Las utilizadas en Microbiología, dado que en los procedimientos se indica habitualmente pipetear una única vez, estas operaciones se

realizarán de la misma forma que se trabaja en rutina, es decir, se tomará el volumen una sola vez.

Es posible que se obtengan resultados insatisfactorios en alguno de los puntos de verificación/calibración. Sin embargo, el equipo puede utilizarse restringiendo su intervalo de medida a aquellos en los que la operación de verificación/calibración haya sido aceptable.

El laboratorio contempla así las siguientes operaciones:

- Verificación trimestral (errores sistemáticos).
- Calibración: bienal y cada vez que un equipo no ha cumplido los requisitos establecidos en la verificación trimestral y haya tenido que manipularse.

3. Realización

El líquido utilizado para la limpieza debe ser apropiado para eliminar el líquido con el que ha sido utilizada la pipeta.

Se deben seguir escrupulosamente las recomendaciones del fabricante del equipo, ya que algunos disolventes pueden dañar los materiales con los que esta fabricada la pipeta.

Hay que tener especial cuidado con las pipetas automáticas y asegurarse de que el líquido de limpieza no entre en contacto con el mecanismo.

Muchas pipetas están diseñadas para ser autoclavables, aunque suelen necesitar un desmontaje parcial previo. Se deben observar las instrucciones del fabricante con respecto a la idoneidad de los medios de esterilización y a la temperatura y presión máximas permisibles.

Si una pipeta ha estado en contacto con sustancias consideradas peligrosas o de riesgo para la salud, es responsabilidad del usuario, asegurarse de que el equipo está completamente descontaminado antes de utilizarse de nuevo en el laboratorio.

Las pipetas deben ser inspeccionadas periódicamente para comprobar que funcionan correctamente y si han sufrido desgaste o daño. Se debe asegurar que el mecanismo funciona correctamente y que la acción del pistón es suave.

El I.V.A.P. debe ser inspeccionado visualmente cuando vaya a utilizarse, quitarle el polvo y la suciedad exterior. Conviene guardar las pipetas de pistón en posición vertical.

El cono porta-puntas debe ser cuidadosamente examinado en busca de marcas o distorsión, ya que es esencial para la precisión de la medida de la pipeta que la punta tenga un buen ajuste para que no se produzca ninguna fuga.

En la mayoría de los casos, será suficiente con lavarlo con etanol al 70% o con una toallita desinfectante y NO con ningún otro disolvente.

Otras comprobaciones de la pipeta deben realizarse utilizando una punta correctamente colocada en el soporte y llena de líquido. Cualquier signo de fuga podría indicar deterioro de los sellos o juntas (o-rings), o un ajuste inadecuado de la punta o una punta inapropiada.

En el caso de los dispensadores, debe prestarse atención al estado tanto del tubo de succión como al del tubo de descarga que serán sustituidos si fuera necesario. Tras su uso, limpiar el interior de los tubos con agua destilada, vaciarlos completamente y dejar secar. Si fuera necesario, limpiar con agua destilada el adaptador de rosca.

Después de cualquier reparación, se debe obtener una declaración de conformidad que indique que el IVAP es conforme con los requisitos de la norma ISO 8655:2002. Para ello se realiza una calibración interna del equipo.

Esta operación debe notificarse y registrarse como operación de mantenimiento correctivo interno del equipo. También se deben registrar las piezas sustituidas, cuando se realice alguna sustitución.

4. Verificación y Calibración

Aunque ambos conceptos muchas veces se solapan, debe hacerse una distinción entre ellos. La verificación es una operación de rutina para asegurar que el funcionamiento de los equipos se mantiene dentro de límites aceptables preestablecidos. La calibración es una operación que determina el volumen real dispensado por un equipo junto con una incertidumbre asociada a ese volumen.

Cada equipo debe ser verificado y calibrado para determinar la exactitud y precisión del volumen dispensado. Es necesario establecer una frecuencia adecuada para realizar dichas operaciones. Esta frecuencia se determinará en función del uso del equipo, del número de personas que lo utilicen, del tipo de líquido dispensado y de las recomendaciones del fabricante del mismo. La operación de verificación debería realizarse al menos una vez al año aunque es más conveniente hacerlo cada 3-4 meses.

Se establece una sistemática trimestral de verificación. Se realizarán dos medidas en cada volumen seleccionado dentro del rango de aplicación del IVAP. De esta manera, si un equipo se encuentra fuera del rango de aceptación de las medidas, es posible actuar y solucionar el problema con rapidez, de manera que las determinaciones analíticas en las que dichos IVAP se utilizan, no se vean afectadas.

La verificación/calibración se realiza comparando el volumen real del agua emitida por el equipo, determinada por método gravimétrico a una temperatura dada, con el volumen nominal del equipo. El proceso permite obtener evidencia objetiva de que cuando se utiliza para dispensar un volumen determinado, no se cometen errores inadmisibles. Los resultados de estas medidas se compararán con los errores máximos permitidos para cada punto de los mismos definidos previamente en lo relativo a los errores aleatorios y sistemáticos y para la aceptación de la calibración.

Se entiende por error sistemático la diferencia entre el volumen dispensado y el nominal o el seleccionado.

Se entiende por error aleatorio la dispersión del volumen dispensado alrededor de la media de los volúmenes dispensados.

Se entiende por error máximo permisible (EMP) el valor extremo superior o inferior permitido para la desviación del volumen dispensado a partir del volumen nominal o del seleccionado.

Este EMP depende sustancialmente del objeto de la medida. Pueden establecerse las categorías definidas en las *Recomendaciones*

En general, en el laboratorio se aplicará el criterio del 2% para todas las pipetas, buretas y para los dispensadores usados en valoración.

Determinación de los errores sistemáticos y aleatorios:

El empleo de este método implica la realización de pesadas de un volumen dado del líquido de ensayo. A estas pesadas las denominamos "datos primarios".

Líquido de ensayo: agua destilada a temperatura ambiente.

Balanza analítica: con resolución adecuada al volumen seleccionado para el ensayo; así para volúmenes $\leq 100 \mu\text{l}$ debe tener una resolución de 0,01 mg y para volúmenes $> 100 \mu\text{l}$ debe tener una resolución de 0,1 mg. Debe estar calibrada.

Recipiente de pesada: matraz con tapón para evitar la evaporación del agua. El matraz, antes de comenzar la verificación/calibración debe contener agua destilada hasta una profundidad de al menos 3 mm.

Habitación en la que vamos a realizar el ensayo: debe tener ambiente estable, sin ventilación y su temperatura debe ser constante ($\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$) entre $15 \text{ }^\circ\text{C}$ y $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tiempo para realizar cada una de las pesadas: no debe exceder de 60 segundos.

Volumen a ensayar: cada equipo debe ser calibrado/verificado al menos a un volumen, según su uso y los volúmenes utilizados frecuentemente. En el caso de un IVAP de volumen fijo es el nominal (V_0) y en el caso de un IVAP de volumen variable, deben seleccionarse tres volúmenes (V_s) para ser ensayados:

El volumen nominal.

Aproximadamente el 50% del volumen nominal.

El límite inferior del intervalo de volumen útil o el 10% del volumen nominal (el que sea mayor).

La medición de más o menos volúmenes es opcional y pueden seleccionarse según el uso del equipo.

Colocar el IVAP, sus correspondientes puntas o jeringas, el recipiente de pesada y el agua destilada en la habitación de la balanza al menos 2 horas antes de comenzar las pesadas.

Preparar la balanza y tener en cuenta el volumen que vamos a pesar para poner el n° de decimales apropiado.

Anotar los datos en el registro de verificación trimestral de IVAP. (Apéndice A)

Para realizar esta toma de datos primarios se utiliza la instrucción que explica la toma automática de datos primarios a partir de la pesada. Esto permite completar las

hojas Excel, que corresponden a los formatos definidos, directamente evitando la transcripción manual de los datos.

Para la calibración se realizarán 10 pesadas del volumen dispensado por el equipo. (Apéndice B)

Con estos datos se calculan directamente tanto los errores sistemáticos y aleatorios, como la incertidumbre asociada a cada uno de los niveles para los que se hayan realizado las diferentes pesadas.

Rellenar los campos: operador, fecha, código y rango del equipo a calibrar, presión, temperatura del ambiente y del agua, códigos del barómetro, balanza y termómetro, volumen nominal (V_0 en μl) y seleccionado (V_s , expresado en μl) del equipo a calibrar y el valor Z correspondiente (UNE-EN ISO 8655-6: 2002) según la temperatura del agua y la presión atmosférica.

Con los datos primarios obtenidos directamente de la balanza. (M_i y M_f)

se calcula la masa en gramos (M) del volumen dispensado:

$$M = M_f - M_i \quad (1)$$

se corrige la masa a volumen (V en ml) aplicando el factor de corrección Z .

$$V(\text{ml}) = M \times Z \quad (2)$$

Posteriormente este volumen se pasa a μl multiplicando por 1000.

y calcula la media de los 10 valores

$$\overline{V}(\mu\text{l}) = \frac{(V_1 + \dots + V_{10})}{10} \quad (3)$$

Directamente se calcula el Error Sistemático (e_s):

En μl :

$$e_s = \overline{V} - V_s \quad (4)$$

$$e_s = \frac{100(\overline{V} - V_s)}{V_s} \quad (5)$$

En porcentaje:

Siendo V_s el volumen seleccionado. En el caso de IVAP fijos, el volumen seleccionado (V_s) es el volumen nominal (V_0) y V_s se sustituye por V_0 .

Y el Error Sistemático Relativo (e_{sr}):

$$e_{sr} = \frac{100(\overline{V} - V_s)}{V_0} \quad (6)$$

En porcentaje:

Se calcula el Error Aleatorio (S_r) como la desviación típica de la repetibilidad:

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (V_i - \overline{V})^2}{n-1}} \quad (7)$$

En μl :

Siendo n el número de mediciones (en este caso 10).

En porcentaje, mediante el Coeficiente de Variación (CV):

$$CV = 100 \frac{S_r}{\overline{V}} \quad (8)$$

Y el Error Aleatorio Relativo (CVr):

$$CV_r = 100 \frac{S_r}{\overline{V}} \times \frac{V_s}{V_0} \quad (9)$$

En porcentaje:

Todos los cálculos se realizan automáticamente tras la toma de los datos primarios.

Se realiza la evaluación de la conformidad por comparación de los resultados obtenidos para los errores con los indicados en las tablas de errores sistemáticos y aleatorios máximos permisibles especificados en la parte 2 de la norma UNE-EN ISO 8655 para las pipetas pistón y en la parte 5 de la misma norma para los dispensadores. Estos errores están introducidos en la hoja de cálculo en la que se toman los datos primarios.

Notas:

En el caso de las pipetas multicanales, cada canal debe ser considerado como independiente, aplicándose como errores máximos permisibles el doble de los indicados en las tablas correspondientes.

Si el volumen nominal de la pipeta de pistón o del dispensador es intermedio entre los dados en las tablas se debe aplicar los valores absolutos para el siguiente volumen nominal mayor.

Los errores máximos sistemáticos y aleatorios permisibles para las pipetas de pistón o dispensadores de volumen variable en todo el intervalo de volumen útil de los mismos, son los referidos al volumen nominal de cada uno de ellos.

5. Cálculo de Incertidumbre

Se considera Calibración a la determinación de los errores sistemáticos y aleatorios junto con la Incertidumbre asociada al proceso.

Para realizar la toma de datos primarios se utiliza, según se ha indicado, la toma automática.

La calibración de un equipo dispensador de líquido accionado mediante pistón presenta dos fuentes de incertidumbre según el ANEXO B ISO 8655-6:2002:

-La incertidumbre del proceso de dispensación en sí mismo, relacionada con el equipo.

-La incertidumbre de medida del volumen emitido por el método gravimétrico.

De acuerdo con la GUM (Guide to Expression of Uncertainty in Measurement), ambas contribuciones tienen que considerarse para la evaluación de la incertidumbre combinada de calibración. Por tanto, puede ser necesaria una evaluación para satisfacer un protocolo de evaluación de calidad.

La experiencia muestra que la contribución de la evaluación de la incertidumbre resultante de la medición del volumen mediante medida gravimétrica es pequeña comparada con la que resulta del proceso de dispensación, siempre que los instrumentos de medida (balanza,

termómetro, barómetro, etc...) se utilicen de acuerdo con las especificaciones dadas. Por tanto, es una buena práctica despreciar esta contribución a la evaluación de la incertidumbre y dar solo los errores sistemáticos y aleatorios de medida resultantes de una medición repetida 10 veces del volumen dispensado para caracterizar el equipo.

Bajo las condiciones mencionadas anteriormente, puede utilizarse la siguiente ecuación simplificada para evaluar la incertidumbre del volumen emitido con el 95% de nivel de confianza.

$$U_{\text{exp an}} = |e_s| + 2 * s_r \quad (10)$$

Evaluación de conformidad de la Incertidumbre calculada en la calibración:

Como criterio de conformidad de las calibraciones, se utiliza el Error Aleatorio Máximo Permisible de acuerdo a lo establecido en las *Recomendaciones*.

CONFORME: Error sistemático Relativo (e_{rs}) (%) + Incert. expandida relat. (Urel) (%) \leq EMP (%)

NO CONFORME: Error sistemático Relativo (e_{rs}) (%) + Incert. expandida relat. (Urel) (%) $>$ EMP (%)

6. Formas de actuación

6.1 Verificación:

Se realizan dos pesadas, en las condiciones especificadas anteriormente, para cada volumen seleccionado para el IVAP.:

1.- Si las pesadas son correctas y cumplen el intervalo de error sistemático fijado, se acepta la verificación. La operación se codifica y se registra como Mantenimiento Interno Preventivo (MIP).

2.- Si las pesadas no son correctas para alguno de los volúmenes:

Se comprueba que las condiciones experimentales son estables y se repite la operación nuevamente.

- Si las pesadas son correctas, se acepta la verificación.

- Si las pesadas no son correctas:

- Se procede a realizar un ajuste del equipo, de acuerdo a las instrucciones del manual correspondiente. (Uso de llaves específicas)

- Se vuelven a realizar las pesadas para todos los volúmenes después del ajuste.

- Si son aceptables, se registra el ajuste en las observaciones del Formato. Se acepta la verificación y se registra como MIP.

- Si continúan siendo incorrectas:

- Informar para que el equipo sea puesto "Fuera de uso".

- Es necesario proceder al despiece del equipo y a la limpieza, revisión y engrase de los diferentes componentes del mismo según se indica en las instrucciones del fabricante de cada uno.

- Tras montar nuevamente la pipeta, realizar una calibración del equipo.

Ésta calibración se adjuntará y se registrará como operación de MIP y como calibración:

- Si es correcta, se pondrá "En uso" el equipo.

- Si solo es válida para algunos volúmenes, se estudiará si se acepta una "Limitación de uso".

- Si es incorrecta se valorarán las medidas a tomar.

6.2 Calibración:

Después de su realización:

1.- Si los resultados son conformes y cumplen los criterios fijados, se acepta la calibración. La operación se codifica y se registra como Calibración Interna (CI).

2.- Si los resultados son no conformes:

Se comprueba que las condiciones experimentales son estables y se repite la operación nuevamente.

- Si los errores y la incertidumbre son correctos, se acepta la calibración.

- Si no son correctos:

- Se procede a realizar un ajuste del equipo, de acuerdo a las instrucciones del manual correspondiente. (Uso de llaves específicas)

- Se vuelven a realizar la calibración para todos los volúmenes después del ajuste.

- Si son conformes, se registra el ajuste en las observaciones del Formato. Se acepta la calibración y se registra como CI.

- Si algún criterio continúa siendo no conforme:

- Informar para que el equipo sea puesto "Fuera de uso".

- Es necesario proceder al despiece del equipo y a la limpieza, revisión y engrase de los diferentes componentes del mismo según se indica en las instrucciones del fabricante de cada uno.

- Tras montar nuevamente la pipeta, repetir la calibración.

Ésta operación se registrará además de cómo CI, como Mantenimiento Interno Correctivo. Si es correcta, se pondrá "En uso" el equipo.

- Si solo es válida para algunos volúmenes, se estudiará si se acepta una "Limitación de uso".

- Si es incorrecta se valorarán las medidas a tomar.

7. Bibliografía

UNE-EN ISO 8655-1: 2002. *Aparatos volumétricos accionados mediante pistón. Parte 1: Terminología, requisitos generales y recomendaciones de uso.*

UNE-EN ISO 8655-2: 2002. *Aparatos volumétricos accionados mediante pistón. Parte 2: Pipetas tipo pistón.*

UNE-EN ISO 8655-3: 2002. *Aparatos volumétricos accionados mediante pistón. Parte 3: Buretas tipo pistón.*

UNE-EN ISO 8655-5: 2002. *Aparatos volumétricos accionados mediante pistón. Parte 5: Dispensadores.*

UNE-EN ISO 8655-6: 2002. *Aparatos volumétricos accionados mediante pistón. Parte 6: Métodos gravimétricos para la determinación del error de medición.*

Recomendaciones para la calibración del material volumétrico en el laboratorio clínico. Sociedad Española de Bioquímica y Patología Molecular.

Measurement Good Practice Guide N° 69. The calibration and use of Piston Pipettes. Blues, J., Bayliss, D. y Buckley, M.

8. Apéndice A

REGISTRO DE VERIFICACIÓN TRIMESTRAL DE I.V.A.P.

TRIMESTRE

AÑO:

OPERADOR:

EQUIPO	VOLUMEN	PESO 1	PESO 2		RANGO ACEPTACIÓN		FECHA	OBSERVAC.
					MIN	MAX		
	5 µL	INACEPT		INACEPT	0,0045	0,0055		
	20 µL	INACEPT		INACEPT	0,0195	0,0205		
	40 µL	INACEPT		INACEPT	0,0395	0,0405		
	1 mL	INACEPT		INACEPT	0,9400	1,0600		
	5 mL	INACEPT		INACEPT	4,9400	5,0600		
	10 mL	INACEPT		INACEPT	9,9400	10,0600		
	20 µL	INACEPT		INACEPT	0,0184	0,0216		
	100 µL	INACEPT		INACEPT	0,0984	0,1016		
	200 µL	INACEPT		INACEPT	0,1984	0,2016		
	30 µL	INACEPT		INACEPT	0,0260	0,0340		
	150 µL	INACEPT		INACEPT	0,1460	0,1540		
	300 µL	INACEPT		INACEPT	0,2960	0,3040		
	100 µL	INACEPT		INACEPT	0,0920	0,1080		
	500 µL	INACEPT		INACEPT	0,4920	0,5080		
	100 µL	INACEPT		INACEPT	0,9920	1,0080		

