



ORIGINAL

Propuesta de un procedimiento de validación de un método para la determinación de cinc sérico: cumplimiento de los requisitos de la ISO 17025



CrossMark

M.T. Llorente Ballesteros*, I. Navarro Serrano y J.L. López Colón

Instituto de Toxicología de la Defensa, Madrid, España

Recibido el 27 de mayo de 2015; aceptado el 4 de agosto de 2015

Disponible en Internet el 3 de noviembre de 2015

PALABRAS CLAVE

Acreditación;
Validación;
ISO 17025;
Cinc sérico

Resumen

Objetivo: Elaborar un esquema de validación de una técnica analítica siguiendo los requisitos de la ISO 17025.

Material y métodos: Teniendo en cuenta la ISO 17025, los parámetros verificados fueron: selectividad, modelo de calibración y linealidad, precisión, exactitud, incertidumbre de medida e interferencias analíticas.

Resultados: El procedimiento desarrollado fue aplicado satisfactoriamente para cuantificar cinc en suero por espectrofotometría de absorción atómica.

Conclusión: Finalmente, se ha demostrado que nuestro método cumple con los requisitos exigidos de selectividad, linealidad, exactitud y precisión, haciéndolo adecuado para el fin requerido.

© 2015 SECA. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Accreditation;
Validation;
ISO 17025;
Serum zinc

Validation of an in-house method for the determination of zinc in serum: Meeting the requirements of ISO 17025

Abstract

Objective: The aim of this report is to propose a scheme for validation of an analytical technique according to ISO 17025.

Material and methods: According to ISO 17025, the fundamental parameters tested were: selectivity, calibration model, precision, accuracy, uncertainty of measurement, and analytical interference.

Results: A protocol has been developed that has been applied successfully to quantify zinc in serum by atomic absorption spectrometry.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: maitellorente2000@hotmail.com (M.T. Llorente Ballesteros).

Conclusion: It is demonstrated that our method is selective, linear, accurate, and precise, making it suitable for use in routine diagnostics.
 © 2015 SECA. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

El laboratorio clínico resulta esencial en el diagnóstico del paciente. Ejerce un papel clave en la monitorización de un determinado tratamiento y en la evolución de una enfermedad. En este sentido es necesario asegurar que se cumple con las necesidades clínicas, garantizando la calidad de los resultados analíticos. Por ello, la acreditación del laboratorio juega un papel esencial. Esta puede llevarse a cabo por la norma *International Standard Organization* (ISO) 17025 (laboratorios de ensayo y calibración) o por la norma ISO 15189 (norma específica para el laboratorio clínico). Además, la acreditación en los laboratorios clínicos puede ser obligatoria, como ocurre en el caso de Francia o Corea, o voluntaria, como es el caso de España¹. Con base en lo anterior, la acreditación de un laboratorio clínico de referencia que recibe muestras de otros laboratorios debería considerarse un objetivo prioritario.

Muchos de los requisitos técnicos de la norma ISO 17025 se encuentran incluidos en la ISO 15189. La esencia de ambas normas es la misma, aunque la forma de presentar los requerimientos en la norma 15189 es más fácilmente asumible para los profesionales del laboratorio clínico. La ISO 15189 es la norma de reconocimiento internacional para demostrar la competencia técnica de los laboratorios clínicos²⁻⁴.

El alcance de la acreditación será el conjunto de ensayos para los que el laboratorio ha demostrado su competencia técnica. El laboratorio deberá elegir el procedimiento más adecuado para la validación de las técnicas analíticas, dado que esta resulta ser una pieza clave para la acreditación.

El objetivo de este estudio fue desarrollar un procedimiento para la validación de la determinación de cinc en suero por espectrofotometría de absorción atómica por llama, cumpliendo los requisitos de la norma ISO 17025.

Material y método

Método para la determinación de cinc (Zn) en suero por espectrofotometría de absorción atómica por llama. El equipo empleado fue el espectrofotómetro AAnalyst 300 Spectrometer (Perkin Elmer Inc., EE. UU.), con llama de aire/acetileno^{4,5}.

Disoluciones de calibrado: a partir del patrón madre de Zn de 1.000 mg/L (CAS N9300168, Zn Pure Grade Atomic Spectroscopy Calibration Standard, Perkin Elmer Inc.), se prepararon las disoluciones de calibrado 25, 50, 100, 200 y 400 µg/L⁶.

Patrones de calibración, controles y muestras: se prepararon diluyendo 300 µL del patrón, del control y de la muestra, respectivamente, con 2.000 µL de agua desionizada (18 MΩ·cm) y 20 µL de Triton® X-100 al 10% (CAS 9002-93-1 Triton® X-100 BioXtra Sigma-Aldrich, EE. UU.).

El blanco de calibración se preparó mezclando 100 µL de Triton® X-100 al 10% con 1.000 µL de agua desionizada.

Materiales de referencia: materiales procedentes de un programa de intercomparación de laboratorios organizado por el *Institut National de Santé Publique du Québec, National Public Health Department Canada*: PC SE 1218, PC SE 1306, PC SE 1301, PC SE 1111. Adicionalmente, se prepararon 2 muestras a partir del material de referencia para comprobar la fiabilidad en muestras de valores en el rango alto (adicción sobre material de referencia certificado) y en el rango bajo (dilución del material de referencia certificado).

Procedimiento de la validación: los parámetros evaluados para la validación fueron: selectividad, linealidad de la calibración, sensibilidad, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ), exactitud y precisión, estudio de interferencias (hemólisis), validación/evaluación de la competencia de los analistas e incertidumbre⁷⁻⁹.

Se estableció una planificación de los ensayos a realizar y de los criterios de aceptación, con lo que se desarrolló el itinerario durante el proceso. Se aplicaron las estimaciones mediante las pruebas estadísticas especificadas en la tabla 1.

El calendario de pruebas planificadas fue desarrollado por el responsable del Área de Elementos Traza, basándose en la planificación propuesta en la norma NT 90-210⁵ y en procedimientos internos del laboratorio.

Los criterios de aceptación se eligieron teniendo en cuenta lo siguiente en orden de importancia: criterios normativos o legislativos, bibliografía o aplicaciones técnicas del equipo, y experiencia previa del laboratorio. En este sentido, la elección se basó en lo descrito en la literatura^{5,10-13} y en datos experimentales del ejercicio intercomparativo del que procede el material de referencia certificado proporcionado por el *Institut National de Santé Publique du Québec*.

La planificación de las pruebas a realizar y sus respectivos ensayos incluyó:

Selectividad: la longitud de onda (λ : 213,9 nm) utilizada fue característica del elemento, en este caso del Zn, por lo que no existen interferencias de otros componentes de la muestra.

Linealidad: para evaluar la amplitud del rango lineal se ensayaron 10 niveles de concentración: 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 µg/dL. Los ensayos de calibración se realizaron a lo largo de 10 días. Se estimó la linealidad del intervalo por medio de 2 pruebas estadísticas: estadístico Durbin-Watson, que examinaba los residuos para determinar si había alguna correlación significativa basada en el orden en el que se habían producido los datos, y test F (Fisher), de contraste de varianzas con riesgo del 1%.

Sensibilidad: la sensibilidad se estimó del valor de la pendiente de la recta media de las 10 calibraciones independientes a realizar.

Tabla 1 Planificación de las pruebas a realizar y sus respectivos ensayos

Parámetros	Ensayos	Repeticiones	Días	Niveles de concentración	Número de analistas	Criterio de aceptación
Linealidad	≥ 5	1	≥ 5	≥ 5	> 1	$F_{\text{calculada}} < F_{\text{teórica}}$, Durbin-Watson: $p > 0,05$
LOD	≥ 10	1	1	1	1	Carácter informativo
LOQ	≥ 5	≥ 2	≥ 5	1	> 1	$ZLQ + 2*SLQ < LQ + 25\%*LQ$; $ZLQ - 2*SLQ < LQ - 25\%*LQ$
Exactitud	≥ 5	≥ 2	≥ 5	≥ 3	> 1	$t_{\text{calculada}} < t_{\text{teórica}}$
Precisión						$CV < CVh/\text{intercomparativo}$
Reproducibilidad	≥ 5	≥ 2	≥ 5	≥ 3	> 1	$CVR < CVh \text{ o inter/2}$
Repetibilidad	≥ 2	≥ 5	1	≥ 2	1	$CVr < 2CVh \text{ o inter/3}$
Acreditación de analistas	≥ 5	1	≥ 2	> 1	> 1	$F_{\text{calculada}} < F_{\text{teórica}}$, $t_{\text{calculada}} < t_{\text{teórica}}$ $\pm I < \pm 2DE$
Incertidumbre						

LOD y *LOQ*: se determinaron 30 blancos de calibración. Para estimar el LOD se multiplica la desviación estándar (DE) obtenida por 3,3 ($LOD = 3,3*DE$); por lo tanto, se esperó que el LOQ se encontrara cercano a $10*DE$.

En el LOQ se debía cumplir la siguiente regla⁵:

$$ZLQ + 2 * SLQ < LQ + 25\% * LQ; ZLQ - 2 * SLQ < LQ - 25\% * LQ$$

Donde:

ZLQ es el valor medio obtenido en los ensayos para la muestra empleada para verificar el LOQ.

SLQ es la desviación de la precisión intermedia calculada.

Exactitud: se expresó como el porcentaje de sesgo entre la media del valor obtenido y el valor verdadero o diana.

Cálculo de intervalos de aceptación del valor diana: dependiendo de la procedencia del suero a evaluar se realizó de forma diferente. En caso de intercomparativo será 2 veces la DE del intercomparativo. Si era un material preparado se calculó como 2 veces la DE de Horwitz. Si los intervalos t-Student calculados para el valor medio eran inferiores o iguales a los intervalos calculados para el valor diana se consideraba que se cumplía con los criterios de exactitud. Se comprobó que los límites calculados estaban dentro de los intervalos del valor diana.

Se realizó un test t-Student para evaluar que no había diferencias significativas entre los valores obtenidos y los valores de referencia. En todos los casos se obtuvo que $t_{\text{calculada}} < t_{\text{teórica}}$, por lo que no había diferencias significativas entre ambos valores.

Precisión: se expresó como el porcentaje del coeficiente de variación (CV) entre la DE y la media obtenida. El requerimiento es que el CV obtenido fuera inferior al CV intercomparativo, o en el caso de material de referencia preparado, que fuera inferior al CV de Horwitz (CVh).

$CVh\% = 2 (1 - 0,5) \log c$; también se expresa como $CVh\% = 0,02 \times c 0,8495$

Donde: C = valor nominal del analito expresado en potencia de 10.

Reproducibilidad: fue la precisión bajo las condiciones de reproducibilidad; es decir, con el mismo método, pero variando las condiciones del análisis. Se efectuó durante 12 días diferentes, con distintos operadores. El criterio de aceptabilidad se basó en el CV del intercomparativo o Horwitz, según el origen de la muestra. En el caso de todos las muestras se cumplía que: $\%CVR < 2/3 CVh/\text{inter}$.

Repetibilidad: o precisión bajo condiciones de repetibilidad; es decir, sin variar las condiciones del análisis. Se efectuaron 20 medidas de 2 muestras control en un mismo día. El criterio de aceptabilidad se basó en el CV del intercomparativo o Horwitz, según el origen de la muestra. En el caso de todas las muestras se cumplía que: $\%CVr < CVh/\text{inter}/2$.

Evaluación de los analistas: para evaluar la competencia técnica de los analistas se realizaron una serie de análisis con 2 controles. Se llevó a cabo un test F. Este demostró que no había diferencias estadísticamente significativas entre las varianzas de los analistas en cada uno de los niveles de concentración ensayados. A continuación, se realizó un test t-Student.

Estimación de la incertidumbre: en metrología, 'measurement uncertainty' se define habitualmente como «el parámetro que caracteriza la dispersión de valores que están siendo atribuidos a una cantidad medida»^{10,11}.

Se realizó el análisis de incertidumbre utilizando la visión *top-down*. La aproximación *top-down* es la visión más realista de la incertidumbre, que no queda subestimada como suele suceder en el caso del modelo ISO GUM. Al contrario del modelo de la ISO GUM^{14,15}, no se profundizó en el procedimiento analítico y no se trata a las fuentes del error de manera individual, sino que se planteó el sistema de análisis como si fuese una *black box* o caja negra. Si bien es cierto que se necesitan largas tandas de datos, en su mayoría estas podían provenir del trabajo ya realizado en la validación. Otra ventaja que presenta este método es que en los laboratorios de rutina se dispone de datos de controles a largo plazo, que pueden ser empleados para reevaluar la incertidumbre a lo largo del tiempo.

Estudio de interferencias: se realizó un estudio de la interferencia producida por la hemólisis de las muestras. En una primera fase se analizaron una serie de sueros no hemolizados de manera rutinaria. En una segunda fase se provocó mecánicamente una hemólisis moderada (nivel +) y se repitió el ensayo. En la última fase se hemolizó completamente la muestra (nivel ++). En el análisis estadístico se realizaron 2 test t-Student para ensayos pareados. El primero, suero normal vs. hemolizado (+) (moderadamente hemolizado), y el segundo, suero normal vs. hemolizado (++) (fuertemente hemolizado).

Resultados

Linealidad

Estadístico Durbin-Watson: la probabilidad asociada al estadístico (valor de p) fue superior a 0,05 en todos los calibrados, es decir, superior al nivel de confianza elegido, $\alpha = 0,05$. No había indicio de autocorrelación serial en los residuos y, por lo tanto, no se pudo descartar estadísticamente la linealidad del modelo. Test F (Fisher): el valor F obtenido fue inferior a la F teórica, lo que confirmó la hipótesis de que no existían diferencias entre las varianzas de las poblaciones. Por tanto, el rango de trabajo elegido era lineal con riesgo 1%, $p < 0,001$, y, por ello, el error del modelo era despreciable frente al error experimental.

El rango elegido era lineal y válido el modelo de ajuste matemático. Finalmente, para el método de rutina del laboratorio se pudo elegir una calibración de al menos 4 puntos más el blanco, dentro del intervalo lineal 25-400 $\mu\text{g}/\text{dL}$.

Sensibilidad: la sensibilidad se obtuvo del valor de la pendiente de la recta media de las 10 calibraciones independientes realizadas ($0,000935 \pm 0,000005$).

Límite de detección y límite de cuantificación

Se determinaron 30 blancos de calibración. Para estimar el LOD se multiplicó la DE ($DE = 0,51 \mu\text{g}/\text{dL}$) obtenida por 3,3 ($LOD = 1,53 \mu\text{g}/\text{dL}$); por lo tanto, era de esperar que el LOQ se encontrara cercano a 10^*DE ($LOQ = 5,1 \mu\text{g}/\text{dL}$). A fin de poder verificar el LOQ, se hizo una dilución a un cuarto de un material de referencia de valor 48,05 $\mu\text{g}/\text{dL}$ para obtener un valor próximo al LOQ teórico ($12,12 > 5,1$).

Considerando que se estaban validando 2 equipos iguales con diferente LOQ (en uno el LOQ era 5 y en el otro 10), se preparó un suero próximo a 10 para que los 2 equipos estuviesen acreditados en el mismo rango.

Los ensayos (5 ensayos, 2 repeticiones, ver tabla 2) confirmaron que el rango de la medida del LOQ se encontraba en el intervalo correspondiente al 25% del valor diana.

Se introdujo el valor 10 $\mu\text{g}/\text{dL}$ en el intervalo de calibración para poder cuantificar valores muy deficitarios en Zn, cercanos al LOQ.

Exactitud y precisión

Para la evaluación simultánea de la exactitud y la precisión se analizaron 6 sueros (2 de ellos preparados por el laboratorio) excedentes de un ejercicio intercomparativo con concentraciones crecientes de Zn durante 10 días.

Tabla 2 Validación/evaluación de los analistas

	Analista 1	Analista 2
Media	85,9	171,3
DE	4,1	4,0
Prueba T		
$t_{\text{calculada}}$	1,94	1,94
$t_{\text{teórica}}$	2,45	2,45
$t_{\text{teórica}} < t_{\text{calculada}}$	Cumple	Cumple
p	0,972	0,575
$p > 0,05$	Cumple	Cumple
Prueba F		
$F_{\text{calculada}}$	0,001	0,351
$F_{\text{teórica}}$	5,99	5,99
$F_{\text{teórica}} < F_{\text{calculada}}$	Cumple	Cumple
p	0,972	0,351
$p > 0,05$	Cumple	Cumple

Se realizó cada día una calibración independiente y en el proceso intervinieron distintos operadores. Se obtuvo para el rango normal de Zn en suero¹⁶ (66-110 $\mu\text{g}/\text{dL}$) un exactitud menor al 10% y una precisión inferior al 5%.

Reproducibilidad y repetibilidad

Se determinó la precisión intermedia, representando la DE intermedia frente al valor medio encontrado en cada nivel de concentración (fig. 1), obteniéndose: ($0,77\% x + 0,92$) $\mu\text{g}/\text{dL}$, siendo « x » la concentración de Zn en $\mu\text{g}/\text{dL}$. La repetibilidad obtenida fue de: ($0,76\% x + 0,26$) $\mu\text{g}/\text{dL}$, siendo « x » la concentración de Zn en $\mu\text{g}/\text{dL}$.

Validación de los analistas

Los resultados del test t-Student fueron los siguientes: $t_{\text{analista1}} = 1,94$ ($p = 0,972$) y $t_{\text{analista2}} = 1,94$ ($p = 0,5275$), siendo menor en ambos casos a $t_{\text{teórica}} = 2,45$. La prueba F fue de $F_{\text{analista1}} = 0,001$ ($p = 0,972$) y $F_{\text{analista2}} = 0,001$ ($p = 0,331$), siendo $F_{\text{teórica}} = 5,99$.

Estadísticamente no existieron diferencias significativas entre las mediciones de ambos analistas (ver tabla 2).

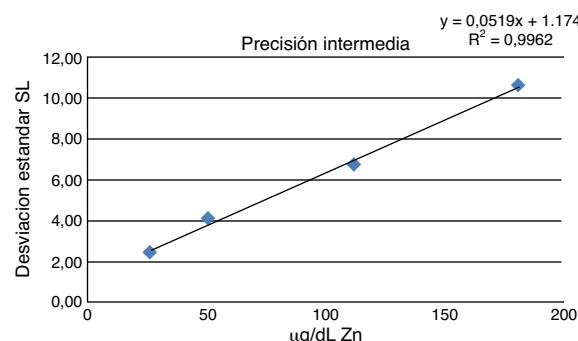


Figura 1 Precisión intermedia. Estimación de la reproducibilidad por medio de una recta de regresión, representando la desviación estándar intermedia frente al valor medio encontrado en cada nivel de concentración.

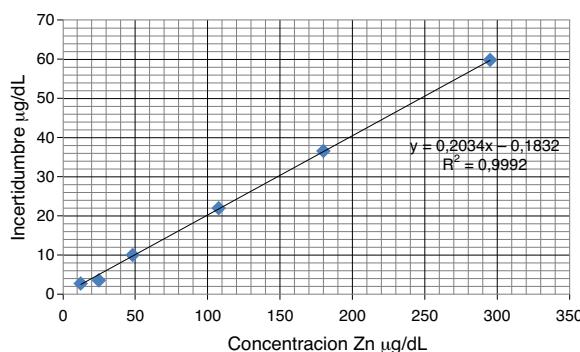


Figura 2 Representación gráfica de los valores medios obtenidos en la validación y su incertidumbre asociada, y posterior ajuste a un modelo lineal de recta de regresión.

Incercidumbre

Se representaron los niveles de concentración frente a los valores de incertidumbre asociada (fig. 2). A continuación se ajustó a un modelo lineal de recta de regresión, pudiendo expresar la incertidumbre como: $(20,34\% \times - 0,18)$ µg/dL, siendo «x» la concentración de Zn en µg/dL.

Se representó la incertidumbre obtenida descompuesta en sus factores y expresados en %U (fig. 3). Se observó que la componente mayoritaria de la incertidumbre corresponde a U del valor verdadero, que es la incertidumbre intrínseca al propio material de referencia utilizado.

Estudio de hemolización

Con los resultados obtenidos se observó que no había diferencia significativa entre el suero normal vs. hemolizado (+); t calculado es $-1,47 < t$ teórico 4,30 ($p = 0,28$).

En el segundo caso, en la comparación suero normal vs. hemolizado (++) se obtuvo un resultado de t calculado: $-4,76 > t$ teórico 4,30 ($p = 0,04$). Por ello, se estimó que había diferencias significativas entre el resultado del suero normal y el hemolizado (++) y, por ello, el grado de hemólisis

deberá tenerse en cuenta en el procedimiento de determinación de Zn en suero en el laboratorio¹⁷.

Discusión

La valoración del estado nutricional y detección de síndromes de deficiencia de Zn requiere de la utilización de técnicas analíticas fiables y validadas. En nuestro caso se observó que todos los parámetros estudiados cumplían los criterios de aceptación especificados (tablas 3 y 4). Por ello, se pudo concluir que el método estaba validado. En este mismo sentido, junto con la validación se han de establecer criterios documentados de calidad analítica claramente establecidos tanto en la norma ISO 17025 como en la norma ISO 15189 a fin de lograr la acreditación^{2,3}. Estos deben incluir, entre otros: uso de muestras control, mantenimiento preventivo de equipos, entrenamiento del personal y auditorías internas.

Con el fin de mejorar la calidad de los resultados analíticos cada método debe ser validado, requisito este obligatorio en caso de querer formar parte de los laboratorios acreditados en todo el mundo. Muchos de los requisitos técnicos de la norma ISO 17025 se encuentran incluidos en la norma ISO 15189, dado que la esencia de ambas normas es la misma. Pese a ello, la norma ISO 17025 obliga a determinar la incertidumbre, cosa que no ocurre en la norma ISO 15189. Aún así, la versión 2013 de la norma 15189 contempla, en el punto 5.5.1.4, que cada laboratorio debe determinar la incertidumbre de medida para cada procedimiento de medición en la fase analítica utilizada para obtener los valores cuantitativos medidos en las muestras de los pacientes. El estudio de la incertidumbre de la medida es importante tanto para el laboratorio como para el clínico que recibe el resultado, y favorece que se emita un informe de resultados más eficaz.

Por otro lado, aunque la norma ISO 17025 es válida para una acreditación, la tendencia en los laboratorios clínicos es hacia la implementación de la norma ISO 15189, norma específica para dichos laboratorios, dado que es más fácilmente asimilable por los profesionales del laboratorio clínico.

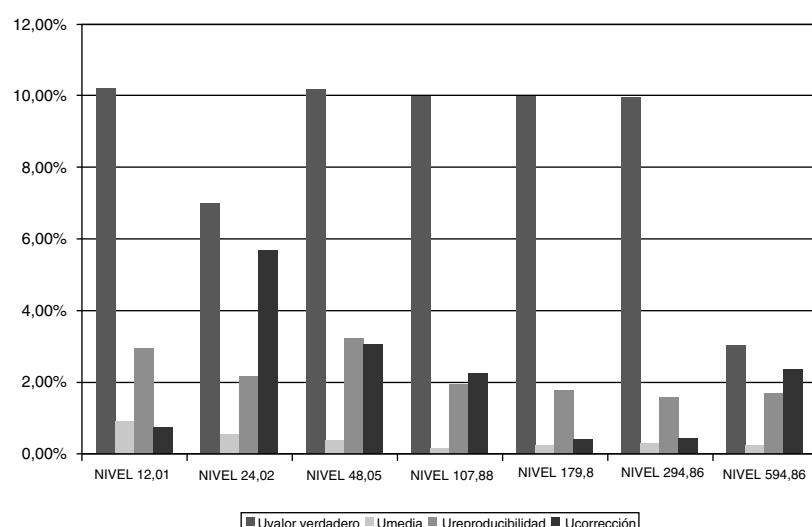


Figura 3 Representación de la descomposición de las componentes de la incertidumbre en cada nivel.

Tabla 3 Resumen de los valores obtenidos en la validación

Parámetro	Resultados										Requisito	Decisión/cumple (sí/no)
<i>Linealidad</i>	10 a 400 µg/dL										Rango de 25 a 400 µg/dL	Sí
Ecuación	$y_{\text{media}} = 0,000935 x + 0,0078$ Coeficiente de ajuste $r^2 = 0,9997$											
Durbin-Watson	Calibrado 1 1,93	Calibrado 2 2	Calibrado 3 2,59	Calibrado 4 1,98	Calibrado 5 2,49	Calibrado 6 1,61	Calibrado 7 1,89	Calibrado 8 1,38	Calibrado 9 1,38	Calibrado 10 2,61	Hipótesis DW: no hay autocorrelación	Sí
p	0,29	0,33	0,07	0,32	0,1	0,14	0,27	0,06	0,07	0,07	Aceptación hipótesis nula $p > 0,05$	Sí
Test F de Fisher	Cumple 0,32	Cumple Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	$F_{\text{calculada}} < F_{\text{teórica}} (2,52)$	Sí
<i>Límite de detección</i>	1,5 µg/dL										Informativo 3*DE	Sí
<i>Límite de cuantificación</i>	Teórico 5,1 µg/dL	Aplicable 12,01 µg/dL										Sí
		CV = 8,2% Cumple										ZLQ + 2*SLQ > LQ + 25%*LQ; ZLQ – 2*SLQ > LQ – 25%*LQ (CV < 25%)

Parámetro	Resultados						Requisito	DECISIÓN/ CUMPLE (SÍ/NO)
Exactitud	Nivel Sesgo t-Student	12,01 8,23% 0,518	24,02 33,89% 0,34	48,05 16,48% 1,222	107,88 1,37% 0,22	179,8 3,97% 0,237	294,86 0,63% 0,298	594,86 0,79% 1,298
Precisión	CV	0,23%	5,03%	7,42%	3,49%	3,26%	2,89%	2,57%
Reproducibilidad	CVh/inter	15,00%	10,20%	10,00%	10,00%	9,98%	9,98%	3,06%
Repetibilidad	CVR	5,19%	±	1,174	0,26			
Incertidumbre	(± I)	2,56	3,54	10,3	21,97	36,5	59,59	41,63
Intervalo de trabajo	Ecuación	10	a	400	μg/dL	± 20,34 x + 0,185		

La mejora continua y el equipo humano son los elementos clave para el mantenimiento de la garantía de calidad en un laboratorio clínico acreditado¹⁸. La acreditación de laboratorios clínicos aumenta la calidad de los resultados analíticos. Además, en la mayoría de los casos, esto es una motivación para el personal del laboratorio y redundar en beneficio de todos los interesados.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Shin BM, Chae SL, Min WK, Lee WG, Lim YA, Lee do H, et al. The implementation and effects of a clinical laboratory accreditation program in Korea from 1999 to 2006. *Korean J Lab Med.* 2009;29:163-70.
- AENOR. UNE-EN ISO 15189:2013. Laboratorios clínicos. Requisitos particulares para la calidad y la competencia. Madrid: Asociación Española de Normalización y Certificación, Comité Europeo de Normalización; 2013.
- AENOR. UNE-EN ISO/IEC 17025:2005. Evaluación de la conformidad. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. Madrid: Asociación Española de Normalización y Certificación, Comité Europeo de Normalización; 2005. p. 1-37.
- Clinical Laboratories: Accreditation scopes NT-48 Rev. 1 Jun 2010. 2010; 17. Spanish National Accreditation Body. [consultado 5 Abr 2015]. Disponible en: www.enac.es
- AFNOR groupe. NF T90-210 Mai 2009. Qualité de l'eau - Protocole d'évaluation initiale des performances d'une méthode dans un laboratoire. [consultado 7 Abr 2015]. Disponible en: www.afnor.fr
- Izquierdo Álvarez S, Calvo Ruata ML, González López JM, García de Jalón Comet A, Escanero Marcén JF. Validation of determination of lead (Pb) in blood by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS) on the basis of interlaboratory comparison data. *J Trace Elem Med Biol.* 2007;21:26-8.
- Yanikkaya-Demirel G. ISO 15189 accreditation: Requirements for quality and competence of medical laboratories, experience of a laboratory II. *Clin Biochem.* 2009;42:279-83.
- Fernández-Calle P, Pelaz S, Oliver P, Alcaide MJ, Gómez-Rioja R, Buño A, et al. The importance of having a flexible scope ISO 15189 accreditation and quality specifications based on biological variation-The case of validation of the biochemistry analyzer Dimension Vista. *Biochem Med (Zagreb).* 2013;23:83-95.
- Garcia Hejl C, Ramirez JM, Vest P, Chianeira D, Renard C. Working towards accreditation by the International Standards Organization 15189 Standard: How to validate an in-house developed method an example of lead determination in whole blood by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Ann Lab Med.* 2014;34:367-71.
- Magnusson B, Näykki T, Hovind H, Krysell M. Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories. Nordtest technical report 537, ed. 3. Nordtest, 2011.
- López Colón JL. *Validación metodológica y cálculo de incertidumbres.* Barcelona: Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular; 2009.
- Thompson M, Ellison S, Wood R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem.* 2015;74:835-55, <http://dx.doi.org/10.1351/pac200274050835>.
- Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: «Aspectos generales sobre la validación de métodos». Guía técnica N.º 1. Santiago: Instituto de Salud

- Pública de Chile; 2010. [consultado 5 Abr 2015]. Disponible en: http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia%20T%C3%A9cnica%201%20validaci%C3%B3n%20de%20M%C3%A9todos%20y%20determinaci%C3%B3n%20de%20la%20incertidumbre%20de%20la%20medici%C3%B3n.1.pdf
14. EURACHEM Guide. Quantifying uncertainty in analytical measurement. Third edition; 2012.
15. Evaluación de datos de medición. Guía para la expresión de la incertidumbre de medida. 2008 (3.^a edición en español 2009). [consultado 7 Abr 2015]. Disponible en: <http://www.cem.es/sites/default/files/gum20digital1202010.pdf>
16. Mayo Clinic. Test ID: ZNS. Zinc, Serum. [consultado 7 Abr 2015]. Disponible en: <http://www.mayomedical laboratories.com/testcatalog/Clinical+and+Interpretive/8620>
17. Koseoglu M, Hur A, Atay A, Cuhadar S. Effects of hemolysis interferences on routine biochemistry parameter. *Biochem Med (Zagreb)*. 2011;21:79–85.
18. Guzel O, Guner EI. ISO 15189 accreditation: Requirements for quality and competence of medical laboratories, experience of a laboratory I. *Clin Biochem*. 2009;42:274–8.