

Evaluación de la exposición prenatal al mercurio: procedimientos operativos estándar



Resumen

El mercurio es tóxico para el ser humano y los efectos de sus diversas formas han sido ampliamente estudiados. La vigilancia biológica humana se considera la herramienta más eficaz para evaluar la exposición acumulada al mercurio. La vulnerabilidad a los efectos perjudiciales del mercurio en el desarrollo neurológico a largo plazo es mayor durante la etapa intrauterina. En consecuencia, la caracterización de la exposición prenatal es crucial para evaluar las consecuencias del mercurio en la salud pública y los beneficios de las medidas dirigidas a reducir la exposición. La estimación de la exposición al mercurio puede abordarse desde diferentes enfoques, incluyendo la medida de las concentraciones de mercurio en diferentes matrices biológicas. El nivel de mercurio en los tejidos puede ser un indicador de la exposición a diversos tipos de mercurio. La validez, utilidad y significado de tales medidas depende, entre otros factores, de la especie química del mercurio y el tipo de tejido analizado. El presente documento incluye una serie de procedimientos operativos estándar que describen la evaluación del mercurio en cabello, sangre de cordón umbilical y orina. El control de calidad es esencial para obtener resultados fiables. Este documento ofrece asimismo información sobre métodos alternativos que pueden aplicarse en el análisis del mercurio.

Palabras clave

Biomarcadores: análisis

Mercurio: análisis

Efectos retardados de la exposición prenatal: análisis

Exposición materna: efectos perjudiciales

Exposición ambiental

Versión original publicada por la Organización Mundial de la Salud Oficina Regional para Europa con el título *Assessment of prenatal exposure to mercury: standard operating procedures*

Evaluación de la exposición prenatal al mercurio: procedimientos operativos estándar [Assessment of prenatal exposure to mercury: standard operating procedures]

ISBN 978-92-4-000284-5 (versión electrónica)

ISBN 978-92-4-000285-2 (versión impresa)

© Organización Mundial de la Salud 2020

Algunos derechos reservados. Esta obra está disponible en virtud de la licencia 3.0 OIG Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual de Creative Commons (CC BY-NC-SA 3.0 IGO; <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/igo/deed.es>).

Con arreglo a las condiciones de la licencia, se permite copiar, redistribuir y adaptar la obra para fines no comerciales, siempre que se cite correctamente, como se indica a continuación. En ningún uso que se haga de esta obra debe darse a entender que la OMS refrenda una organización, productos o servicios específicos. No está permitido utilizar el logotipo de la OMS. En caso de adaptación, debe concederse a la obra resultante la misma licencia o una licencia equivalente de Creative Commons. Si la obra se traduce, debe añadirse la siguiente nota de descarga junto con la forma de cita propuesta: «La presente traducción no es obra de la Organización Mundial de la Salud (OMS). La OMS no se hace responsable del contenido ni de la exactitud de la traducción. La edición original en inglés será el texto auténtico y vinculante».

Toda mediación relativa a las controversias que se deriven con respecto a la licencia se llevará a cabo de conformidad con las Reglas de Mediación de la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual.

Forma de cita propuesta. Evaluación de la exposición prenatal al mercurio: procedimientos operativos estándar [Assessment of prenatal exposure to mercury: standard operating procedures]. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2020. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Catalogación (CIP): Puede consultarse en <http://apps.who.int/iris>.

Ventas, derechos y licencias. Para comprar publicaciones de la OMS, véase <http://apps.who.int/bookorders>. Para presentar solicitudes de uso comercial y consultas sobre derechos y licencias, véase <http://www.who.int/about/licensing>.

Materiales de terceros. Si se desea reutilizar material contenido en esta obra que sea propiedad de terceros, por ejemplo cuadros, figuras o imágenes, corresponde al usuario determinar si se necesita autorización para tal reutilización y obtener la autorización del titular del derecho de autor. Recae exclusivamente sobre el usuario el riesgo de que se deriven reclamaciones de la infracción de los derechos de uso de un elemento que sea propiedad de terceros.

Notas de descarga generales. Las denominaciones empleadas en esta publicación y la forma en que aparecen presentados los datos que contiene no implican, por parte de la OMS, juicio alguno sobre la condición jurídica de países, territorios, ciudades o zonas, o de sus autoridades, ni respecto del trazado de sus fronteras o límites. Las líneas discontinuas en los mapas representan de manera aproximada fronteras respecto de las cuales puede que no haya pleno acuerdo.

La mención de determinadas sociedades mercantiles o de nombres comerciales de ciertos productos no implica que la OMS los apruebe o recomiende con preferencia a otros análogos. Salvo error u omisión, las denominaciones de productos patentados llevan letra inicial mayúscula.

La OMS ha adoptado todas las precauciones razonables para verificar la información que figura en la presente publicación, no obstante lo cual, el material publicado se distribuye sin garantía de ningún tipo, ni explícita ni implícita. El lector es responsable de la interpretación y el uso que haga de ese material, y en ningún caso la OMS podrá ser considerada responsable de daño alguno causado por su utilización.

Traducido por la Organización Mundial de la Salud, Oficina Regional para Europa.

Printed in Switzerland

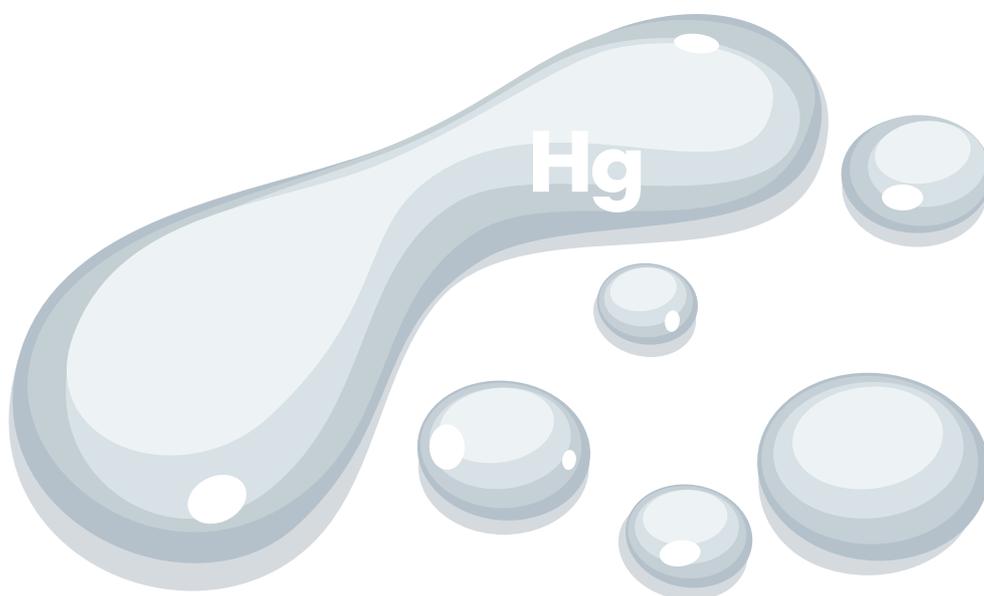
Índice

Agradecimientos	iv
Introducción	1
Programa de control de calidad para la vigilancia biológica humana del mercurio	2
Procedimiento operativo estándar para la determinación de mercurio en cabello humano	35
Procedimiento operativo estándar para la determinación de mercurio en sangre de cordón umbilical	73
Procedimiento operativo estándar para la determinación de mercurio en orina	100
Procedimiento operativo estándar para la determinación de mercurio total en cabello, sangre y orina mediante un método alternativo	138

Agradecimientos

Los procedimientos operativos estándar para la evaluación de la exposición prenatal al mercurio se elaboraron en el marco del proyecto “*Desarrollo de un Plan para el Seguimiento Mundial de la Exposición Humana al Mercurio y sus Concentraciones Ambientales*”, financiado por el Fondo para el Medio Ambiente Mundial.

La Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para Europa agradece el apoyo técnico facilitado por ONU-Medio Ambiente en todas las etapas del proyecto; desde su planificación hasta la organización de las discusiones finales sobre los documentos desarrollados en el marco del proyecto, pasando por la coordinación entre los diversos componentes del proyecto durante la fase de ejecución.



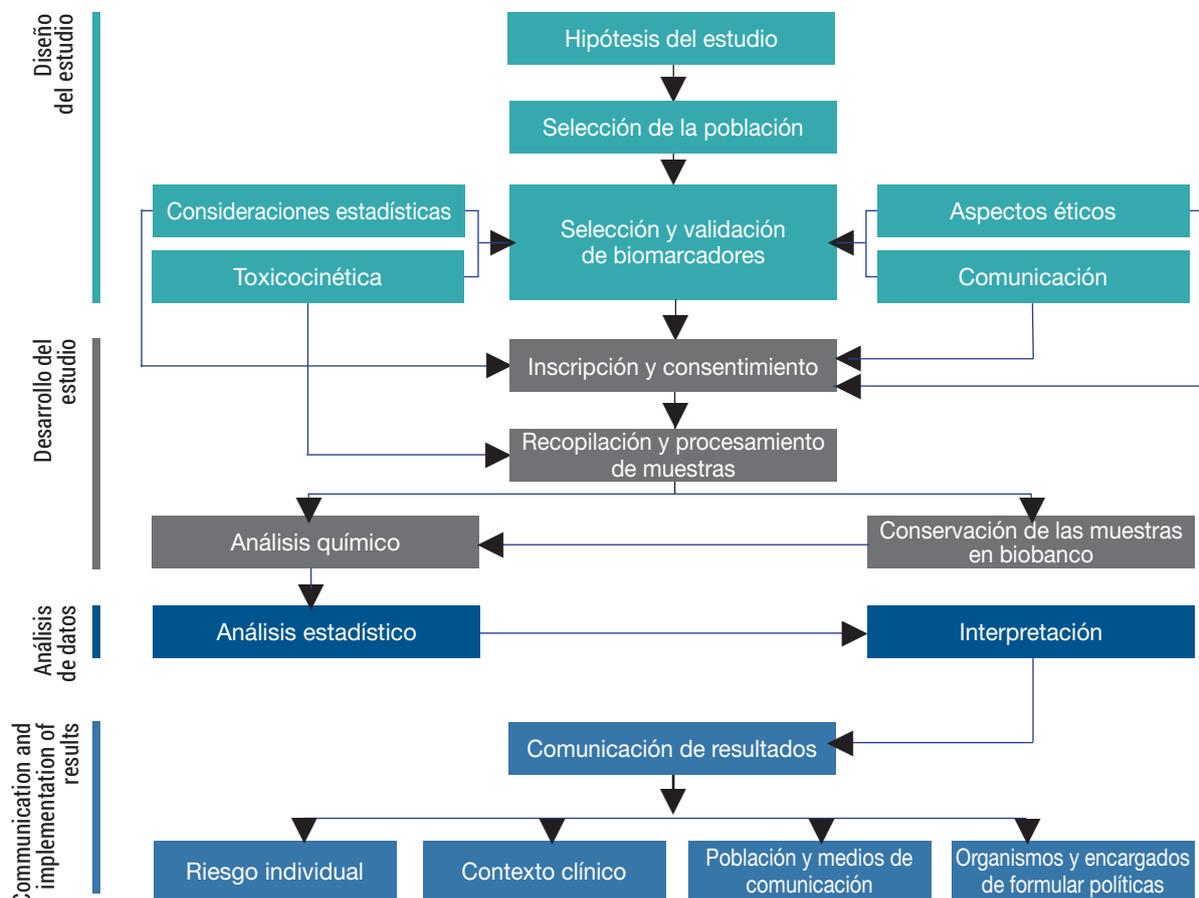
Introducción

La vigilancia biológica humana se ha empleado de manera extensa en el marco de la exposición ocupacional, si bien es cierto que su uso en la evaluación de la exposición ambiental de la población general es reciente. La aplicación de la vigilancia biológica humana en este campo de estudio durante los últimos años ha recibido el impulso de, entre otras, una serie de iniciativas centradas en la mejora de nuestro conocimiento sobre la relación entre el medio ambiente y la salud.

A pesar del potencial de la vigilancia biológica humana en el ámbito de la salud pública, la falta de armonización entre los distintos estudios o programas puede limitar considerablemente la comparabilidad de los resultados, así como la posibilidad de interpretación a nivel mundial y su posterior traducción en políticas. Por tanto, es fundamental desarrollar un marco armonizado que facilite una utilización más eficaz de los datos obtenidos en los estudios de vigilancia biológica humana mediante proyectos, como por ejemplo, el desarrollo de un planteamiento coherente en materia de vigilancia biológica humana en Europa (ESBIO) o el consorcio para la realización de actividades de vigilancia biológica humana a escala europea (COPHES) y su estudio de viabilidad paralelo, DEMOCOPHES, que contaron con el apoyo de la Unión Europea.

La organización de un estudio de vigilancia biológica humana es un proceso complejo que requiere equipos multidisciplinares formados por epidemiólogos, químicos analíticos, toxicólogos, estadísticos, médicos y especialistas en comunicación, que participan en fases específicas del estudio y colaboran para abordar los elementos de interacción entre las diferentes disciplinas implicadas (fig. 1).

Fig. 1. Etapas de un estudio de vigilancia biológica humana



Fuente: Consejo Nacional de Investigación de las Academias Nacionales (1).

Programa de control de calidad para la vigilancia biológica humana de mercurio

Resumen

El objetivo de este documento es definir un sistema eficaz para llevar a cabo actividades de control de la calidad que aseguren la fiabilidad de los resultados en la vigilancia biológica humana, tanto en que la fase preanalítica como en la analítica. Las medidas aquí descritas deben considerarse como recomendaciones generales a tener en cuenta durante la planificación e implementación de estudios de vigilancia biológica humana a escala nacional, regional e internacional. Este documento debe utilizarse junto con los procedimientos operativos estándar para la toma de muestras y análisis de cabello, sangre de cordón umbilical y orina.

Palabras clave

Mercurio: análisis
Compuestos de metilmercurio: análisis
Biomarcadores: análisis
Exposición materna
Intercambio materno-fetal
Bebé, recién nacido
Exposición ambiental
Control de calidad
Salud pública

Colaboradores

Argelia Castaño Calvo
Centro Nacional de Sanidad Ambiental del Instituto de Salud Carlos III (España)
Marta Esteban López
Centro Nacional de Sanidad Ambiental del Instituto de Salud Carlos III (España)
Miguel Ángel Lucena
Centro Nacional de Sanidad Ambiental del Instituto de Salud Carlos III (España)

Índice

Abreviaturas.....	4
Introducción	5
1. Control de calidad en la fase preanalítica.....	5
2. Control de calidad en la fase analítica	9
2.1. Controles de calidad internos.....	9
2.1.1. Material de referencia.....	9
2.1.2. Equipos.....	9
2.1.3. Conservación de las muestras	10
2.1.4. Preparación de curvas de calibración.....	10
2.1.5. Análisis de blancos de ensayo	13
2.1.6 Duplicado de muestras	13
2.1.7 Controles de calidad	14
2.2. Controles de calidad externos.....	15
2.2.1. Asignación del valor a la muestra	16
2.2.2. Determinación de la desviación típica para las pruebas de aptitud $\hat{\sigma}$	16
2.2.3. Criterios para la selección del número de medidas que se llevarán a cabo en cada uno de los laboratorios participantes	19
2.2.4. Procedimiento para el ensayo de homogeneidad.....	19
2.2.5. Procedimiento para la prueba de estabilidad	21
2.2.6. Instrucciones dirigidas a los participantes.....	21
2.2.7. Cálculo de los parámetros estadísticos asociados a los resultados de la prueba de aptitud.....	22
2.2.8. z - score	21
2.2.9. Número En.....	23
2.2.10. z' - score.....	23
2.2.11. zeta – score (ζ)	24
2.2.12. Valor Ez.....	24
3. Evaluación de la aptitud de los laboratorios.....	25
4. Referencias y bibliografía	26
Anexo 1. Registro de recepción de muestras.....	27
Anexo 2. Registro de muestras obtenidas	28
Anexo 3. Autoevaluación de la competencia de los laboratorios.....	29

Abreviaturas

VBH vigilancia biológica humana

ID identificación

Introducción

Las medidas de control de calidad suelen aplicarse de manera rutinaria en la fase analítica. Durante el análisis químico, los laboratorios se sirven, entre otros medios, de blancos, curvas de calibración y muestras de control para garantizar la fiabilidad de sus resultados. Sin embargo, a menudo no se aplican medidas de control similares en otras etapas de los estudios de vigilancia biológica humana a pesar de que su importancia puede ser igual o incluso mayor desde el punto de vista del control de la calidad.

Cabe destacar que todas las medidas de precaución y control tomadas durante el análisis químico serán en vano si las muestras se contaminan o alteran durante el proceso de toma de muestras, transporte o procesamiento. En consecuencia, las medidas de control no deben limitarse al laboratorio sino que deben abarcar también todos los pasos de la fase preanalítica, en especial durante la toma de muestras (materiales, recipientes, procedimientos y documentación), el transporte (temperatura y requisitos de envío), la preparación de muestras (centrifugación, extracción, etc.), la preparación de alícuotas y el almacenamiento. En etapas posteriores, este control debe incluir los análisis químicos así como el análisis de los datos, mediante la aplicación del control de calidad a las bases de datos generadas.

1. Control de calidad en la fase preanalítica

La fase preanalítica tiene una repercusión significativa en la integridad de las muestras en todos los estudios que incluyen muestras biológicas. En general, existen dos tipos de factores que pueden alterar la muestra antes de su análisis.

- Los factores influyentes surgen antes de que se obtenga la muestra y son específicos para cada biomarcador. Entre los ejemplos de factores influyentes que pueden modificar la concentración de los biomarcadores se encuentran el tiempo de vida media de una sustancia química, el consumo de alcohol, la administración de medicamentos o los hábitos individuales, como el tipo de dieta. Por tanto, estos factores deben tenerse en cuenta durante el diseño del estudio, al seleccionar la población, las consideraciones estadísticas, las estrategias de muestreo, la captación de voluntarios o la selección del biomarcador o matriz, así como al interpretar los resultados.
- Por otra parte, en el caso de los factores interferentes, la concentración del biomarcador se modifica después de la recogida de la muestra debido, por ejemplo, a la contaminación externa, los cambios físicos o químicos en el biomarcador durante el transporte o almacenamiento de la muestra, o como consecuencia de alteraciones de la matriz biológica, como la coagulación o sedimentación. Es posible tomar una serie de medidas preventivas para evitar estas alteraciones, así como la posible contaminación durante la toma, el transporte, el procesamiento y almacenamiento de las muestras. Por otro lado, es recomendable llevar a cabo un entrenamiento apropiado del personal del equipo de campo en las tareas a desarrollar.

En los estudios de vigilancia biológica humana sobre la población general, y por tanto en principio no expuesta a concentraciones elevadas, resulta aún más importante el control de la fase preanalítica que en otra clase de estudios debido a sus características, principalmente por el tipo de sustancias analizadas y los rangos de concentración observados normalmente en la población general.

Además, al medir un contaminante ambiental existe el riesgo de contaminación de la muestra debido a la presencia de dicha sustancia en el ambiente. Esto es especialmente relevante en el caso de las sustancias químicas ubicuas, que pueden incluso encontrarse en el material de empleado en la toma de muestras (2). Asimismo, dado que la exposición a contaminantes ambientales tiene lugar en general a bajas concentraciones, sus niveles en las matrices biológicas tienden también a ser bajos, por lo que una posible contaminación puede tener gran influencia sobre los resultados.

En consecuencia, es crucial identificar y evitar las posibles fuentes de contaminación, como por ejemplo:

- la contaminación exógena en el lugar de muestreo;
- la contaminación de fondo presente en el equipo o los recipientes en los que se toma la muestra;
- la contaminación debida a la absorción de los componentes de interés en las paredes del recipiente empleado.

Es necesario por tanto identificar los factores influyentes correspondientes al biomarcador específico y diseñar una estrategia de muestreo que los tenga en cuenta. Por último, se debe registrar toda la información necesaria para poder llevar a cabo una adecuada interpretación de los resultados.

Para lograr un control de calidad adecuado pueden emplearse diversas herramientas y los procedimientos operativos estándar suelen ser el recurso más útil. Estos representan una descripción escrita, clara, concisa, que recoge paso a paso y de forma pormenorizada el proceso seguido durante la toma de muestras, la captación de voluntarios o la aplicación de un método analítico.

Los procedimientos operativos estándar se pueden aplicar a todas las etapas de un estudio con el objetivo obtener la información básica para el control de calidad. Su uso permite comparar los resultados entre distintos laboratorios o equipos de investigación. Teniendo en cuenta lo anterior, los procedimientos operativos estándar para la selección de participantes y su captación deben desarrollarse junto con los de toma de muestras, transporte, tratamiento y almacenamiento de muestras, con el objeto de controlar, en la medida de lo posible, todos los factores que pueden afectar a las muestras durante la fase preanalítica.

Otras medidas de control que pueden aplicarse son la utilización de blancos de campo o la utilización de muestras duplicadas. Es posible recoger distintos tipos de blancos sobre el terreno con el fin de evaluar la posible contaminación de una muestra durante la toma de muestras o su transporte hasta el laboratorio. Para ello, es posible emplear un tubo o recipiente vacío del mismo lote que el resto del material como blanco de muestreo. Estos blancos resultan especialmente útiles para identificar la contaminación ambiental o cuando no se ha realizado un control previo de la contaminación de fondo presente en el material. Los blancos se pueden preparar también durante la preparación de alícuotas. Los blancos deben tratarse y manipularse de la misma manera que las muestras reales con el fin de evaluar la contaminación potencial durante el proceso real.

Otro aspecto importante es asegurar que la muestra obtenida sea representativa y refleje la composición de la muestra original. Por consiguiente, antes de la preparación de las alícuotas es preciso homogeneizar convenientemente las muestras. Otras herramientas de control adecuadas son las listas de verificación, donde figura todo el material necesario o los puntos importantes que se han de comprobar en un determinado proceso.

Se debe prestar especial atención a los materiales para la toma y almacenamiento de las muestras, ya que se han descrito diversos tipos de interferencias entre los materiales de fabricación de los recipientes o tubos empleados en la toma de muestras y la sustancia química de interés. Así, por ejemplo, para la determinación de metales debe evitarse el material de vidrio (3). Del mismo modo, algunos tipos de plástico pueden aumentar los niveles del biomarcador analizado, como ocurre por ejemplo en el caso del bisfenol A o los ftalatos (2).

El control del material de toma y conservación de muestras es crucial en la vigilancia biológica humana ya que, como se ha mencionado anteriormente, las concentraciones medidas suelen ser del orden de partes por millón o partes por billón (o incluso inferiores), lo que significa que una mínima contaminación de fondo puede tener importantes consecuencias en los resultados finales.

Con el fin de controlar esta posible fuente de errores, se pueden aplicar las siguientes estrategias para evaluar el material de muestreo:

- Realizar una inspección previa del material de muestreo, que consiste en el análisis de un lote de recipientes o tubos de toma de muestras antes de llevar a cabo el muestreo, con el propósito de garantizar que la contaminación de fondo sea insignificante ($<$ límite de detección) y no afecte así a la medida final. Se debe tomar esta precaución también con el material empleado para almacenar las muestras.
- En algunas situaciones, los materiales del muestreo y almacenamiento pueden ser tratados con anterioridad a fin de eliminar cualquier posible contaminación de fondo. Por ejemplo, los recipientes empleados para la toma de muestras de orina para el análisis de metales pueden lavarse con una solución de ácido nítrico diluido para eliminar así las posibles trazas de metal presentes. Se debe comprobar el efecto de un tratamiento previo de este tipo mediante el análisis del 5% del material pretratado.
- Utilizar materiales en los que se certifique una concentración mínima del biomarcador de interés. Algunos materiales comerciales van acompañados de certificados que indican la ausencia o el contenido mínimo de una determinada sustancia química. Por ejemplo, existen en el mercado tubos especiales para el análisis de metales traza en las muestras de sangre.

Un aspecto crucial de la fase preanalítica es la definición del momento óptimo de la toma de muestras (4). Para llevarla a cabo de forma correcta se requiere un procedimiento operativo estándar que incluya instrucciones detalladas para cada uno de los pasos a seguir. Asimismo, resulta muy útil como medida de control el registro por escrito de todo lo que suceda durante el muestreo, así como toda la información relacionada con las muestras (fecha y hora de la toma, volumen, longitud y color). Esta información puede ayudar a identificar, por ejemplo, la contaminación cruzada de una muestra (por ejemplo, la contaminación con sangre de una muestra de orina tomada tras el parto). Asimismo, un trabajo de campo bien documentado facilita la comunicación y ayuda a evitar los errores y malentendidos en el equipo de trabajadores de campo y entre estos y el personal de laboratorio.

Por último, es fundamental garantizar la trazabilidad de las muestras y para ello, es necesario identificar de manera inequívoca las muestras y los documentos relacionados (cuestionarios y datos personales).

En consecuencia, es preciso comprobar la calidad de las etiquetas empleadas con el fin de asegurar la legibilidad del código de identificación (ID), independientemente de la temperatura y el nivel de humedad y, por supuesto, garantizar que no se despeguen del tubo, recipiente o documento.

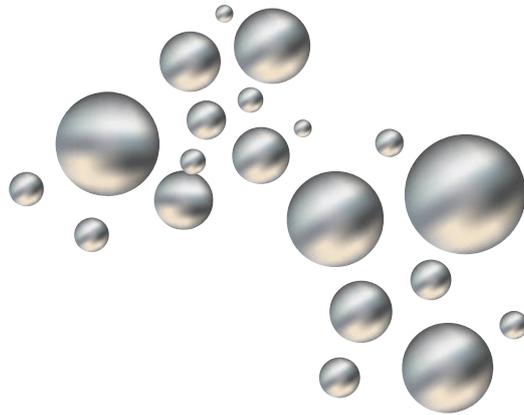
Tras su toma, las muestras deben transportarse de acuerdo con las condiciones de conservación requeridas para preservar su integridad. Este es otro punto de control crucial. El transporte al laboratorio debe realizarse cumpliendo los reglamentos para el transporte de materiales biológicos.

La etapa final de la fase preanalítica consiste en el almacenamiento de las muestras y su conservación en biobancos si esto forma parte de las actividades planificadas. No obstante, no se debe perder de vista la importancia del paso previo, la recepción de las muestras, así como la aplicación de los criterios de rechazo o aceptación de las muestras. Aunque en ocasiones no se tengan en cuenta estos aspectos, son puntos de control cruciales.

Cuando las muestras llegan al laboratorio, es necesario comprobar la integridad del embalaje y las condiciones de los recipientes y tubos de ensayo. Cualquier problema identificado, como por ejemplo roturas o desperfectos en los embalajes o derrames de las muestras, debe quedar convenientemente registrado. Para ello, es recomendable establecer un protocolo para la recepción de muestras que especifique cada uno de los elementos que se debe comprobar y que permita documentar los problemas encontrados en una hoja de registro (anexos 1 y 2).

Los requerimientos técnicos para el óptimo transporte de muestras deben definirse de antemano para poder así establecer los puntos críticos de control. La comprobación debe llevarse a cabo de fuera a dentro, es decir, primero se verificará el estado del embalaje y a continuación, se abrirá y se continuará con el examen en su interior. Si las muestras biológicas van acompañadas de cuestionarios o de otros documentos, estos deberán ser comprobados también en el momento de la recepción y en ese momento se han de aplicar los criterios de rechazo o aceptación de muestras definidos previamente.

Aunque los procedimientos operativos estándar son herramientas de apoyo esenciales, no ofrecen una solución integral y deben complementarse con la capacitación del personal de laboratorio y de los trabajadores de campo.



2. Control de calidad en la fase analítica

Desde un punto de vista analítico, es fundamental establecer un programa para el aseguramiento y el control de calidad que permita garantizar la fiabilidad y comparabilidad de los resultados. Tales programas deben abarcar las medidas básicas de aseguramiento y control de la calidad aplicadas de manera rutinaria en los laboratorios analíticos así como las actividades externas dirigidas a asegurar la comparabilidad y calidad de los resultados.

Los controles de calidad internos son una herramienta básica en los laboratorios analíticos, ya que es fundamental armonizar las actividades de control y los procedimientos operativos estándar que se utilizan para obtener los resultados de laboratorio. En consecuencia, las actividades de control de calidad deben ser uno de los puntos fundamentales en el procedimiento de trabajo descrito y antes de llevar a cabo cualquier ensayo, se han de establecer claramente los criterios de tolerancia.

En la validación del método, deben considerarse los parámetros relativos a los blancos, controles de repetitividad, de reproducibilidad o veracidad. No se deben comunicar resultados externos si no se cumplen los criterios de calidad internos asociados a análisis y la confirmación por parte del laboratorio del cumplimiento de dichos requisitos.

El presente procedimiento concierne al desempeño de los controles de calidad asociados a los métodos instrumentales, normalmente métodos basados en la preparación de curvas de trabajo en las que se interpolan los resultados de las muestras analizadas.

Los ejercicios de comparación entre laboratorios pueden considerarse una medida de la capacidad de un laboratorio. Con el fin de obtener información suficiente sobre el desempeño de un laboratorio, se deben plantear al menos tres rondas: antes, durante y después del análisis de las muestras de estudio. De esta manera se puede evaluar la exactitud de los resultados de los participantes y garantizar la validez del estudio.

La participación en cada una de estas rondas debe evaluarse de acuerdo a los criterios definidos. En caso de obtener resultados no satisfactorios en alguna de las rondas del ejercicio, será necesario identificar las causas y aplicar las medidas oportunas para su corrección o eliminación. En este sentido, los ejercicios de comparación entre laboratorios permiten demostrar el desempeño adecuado de unos laboratorios en comparación con otros.

2.1. Controles de calidad internos

2.1.1. Material de referencia

Los controles de calidad internos deben llevarse a cabo utilizando material de referencia certificado, siempre que sea posible. Dicho material debe ser certificado y trazable. Asimismo, debe contar con una incertidumbre asociada de manera que puedan evaluarse los intervalos de confianza, permitiendo así que el laboratorio determine la exactitud de sus resultados.

Cualquier manipulación de este material de referencia, por ejemplo, su dilución para obtener concentraciones inferiores al valor nominal, implica que el laboratorio debe calcular la nueva incertidumbre a partir de la incertidumbre inicial del material de referencia y todas las aportaciones asociadas al material volumétrico empleado durante la preparación. Si el método analítico ha sido validado de manera adecuada, estas incertidumbres se habrán tenido en cuenta y, por consiguiente, estarán incluidas en las tolerancias definidas de la validación.

2.1.2. Equipos

Todos los equipos que puedan afectar al resultado del análisis químico deben ser calibrados. En este sentido, los laboratorios deben haber definido con anterioridad los valores de tolerancia que se aplicarán para aceptar o rechazar los resultados de dichas calibraciones.

El material volumétrico debe alcanzar la tolerancia establecida para su clase, aunque como norma general, solo debería utilizarse el de clase A.

Para pesar de los patrones o muestras deben emplearse balanzas de precisión siempre que sea necesario. Por ejemplo, en el caso de los análisis en cabello, no debería pesarse menos de 30 mg de muestra o de patrón, si la balanza tiene una resolución de 0,1 mg (balanza de cuatro decimales). Si el laboratorio dispone de una balanza de cinco decimales, no debería usarse para pesar menos de 3 mg. Las medidas de peso por debajo de estos valores introducirían errores que podrían afectar a la incertidumbre en el resultado final o aumentar el error en el análisis.

2.1.3. Conservación de las muestras

La conservación de las muestras es crucial para obtener resultados válidos. El laboratorio debe contar con procedimientos por escrito para evitar la degradación o contaminación de las muestras. Se deben definir las condiciones de almacenamiento (temperatura, luminosidad, impermeabilidad y hermeticidad, humedad y tiempo de almacenamiento).

Las muestras de orina o sangre deben almacenarse refrigeradas (<5 °C) en la oscuridad, en un recipiente hermético e impermeable, hasta el momento de su análisis. Las muestras de cabello se pueden almacenar a temperatura ambiente, pero deben mantenerse alejadas de la humedad.

Los laboratorios deben asegurar la imposibilidad de la contaminación de muestras. Toda manipulación de las muestras se llevará a cabo en zonas limpias. Los blancos, que deben ser tratados de igual forma que las muestras, pueden ser buenos indicadores de la limpieza del proceso.

2.1.4. Preparación de curvas de calibración

El laboratorio debe preparar una curva de calibración cada tres meses como mínimo, a utilizar hasta la realización de la siguiente. Se deben elaborar rectas de al menos cinco puntos. El intervalo cubierto por la recta debe comprender los valores previstos para todas las muestras, o al menos para la mayoría.

Si el laboratorio dispone de una validación del método en la que se hayan obtenido los parámetros asociados a la curva, junto con las tolerancias para estos parámetros, la curva de calibración debe cumplir con dichos criterios de aceptación.

Si por el contrario no se dispone de un proceso de validación de método, el laboratorio deberá establecer de antemano los criterios de aceptación para al menos dos de los siguientes parámetros: el coeficiente de regresión, el coeficiente de linealidad o la pendiente.

Coeficiente de regresión

El coeficiente de regresión (r) es una manera de determinar el porcentaje de variabilidad total de una variable dependiente (y) en relación con su media, que viene determinada por el modelo de regresión. Este parámetro es una buena medida de la calidad del ajuste de la curva de regresión.

El coeficiente de regresión se considera adecuado si es superior al indicado en la tabla 1, para el coeficiente de confianza admitido y con los grados de libertad correspondientes. Normalmente, se acepta como apropiado un intervalo de confianza del 95%. Este intervalo corresponde a la columna con el valor 0,05. N es el número de puntos utilizados para construir la curva.

Tabla 1. Valores críticos de la r de Pearson para una prueba unilateral según grados de libertad (N-2)

N-2	0,05	0,025	0,01	0,005
1	0,988	0,997	0,9995	0,9999
2	0,900	0,950	0,980	0,990
3	0,805	0,878	0,934	0,959
4	0,729	0,811	0,882	0,917
5	0,669	0,754	0,833	0,874
6	0,622	0,707	0,789	0,834
7	0,582	0,666	0,750	0,798
8	0,549	0,632	0,716	0,765
9	0,521	0,602	0,685	0,735
10	0,497	0,576	0,658	0,708
11	0,476	0,553	0,634	0,684
12	0,458	0,532	0,612	0,661
13	0,441	0,514	0,592	0,641
14	0,426	0,497	0,574	0,623
15	0,412	0,482	0,558	0,606
16	0,400	0,468	0,542	0,590
17	0,389	0,456	0,528	0,575
18	0,378	0,444	0,516	0,561
19	0,369	0,433	0,503	0,549
20	0,360	0,423	0,492	0,537
21	0,352	0,413	0,482	0,526
22	0,344	0,404	0,472	0,515
23	0,337	0,396	0,462	0,505
24	0,330	0,388	0,453	0,496
25	0,323	0,381	0,445	0,487
26	0,317	0,374	0,437	0,479
27	0,311	0,367	0,430	0,471
28	0,306	0,361	0,423	0,463
29	0,301	0,355	0,416	0,456
30	0,296	0,349	0,409	0,449
35	0,275	0,325	0,381	0,418
40	0,257	0,304	0,358	0,393
45	0,243	0,288	0,338	0,372
50	0,231	0,273	0,322	0,354
60	0,211	0,250	0,295	0,325
70	0,195	0,232	0,274	0,302
80	0,183	0,217	0,256	0,283
90	0,173	0,205	0,242	0,267
100	0,164	0,195	0,230	0,254

Fuente: Universidad de Valencia (5).

Coeficiente de linealidad

El coeficiente de linealidad (Cm) es una medida de la calidad del ajuste comparada con una línea recta

$$Cm = \left(1 - \frac{Sm}{m}\right) 100$$

donde

Sm es la desviación de la pendiente, y m la pendiente.

- Si se dispone de un histórico de valores del coeficiente de linealidad, se debería establecer como criterio de aceptación la media de los valores de Cm (\overline{Cm}) de la serie de curvas disponibles, menos $t_{Student}$ veces la desviación típica para estos valores Cm , ($SD_{\overline{Cm}}$), como límite inferior, y 100 como límite superior ($t_{Student}$ obtenida a partir del número de valores utilizados).

$$\overline{Cm} - (t_{student} \times SD_{\overline{Cm}}) \leq Cm_{current} \leq 100$$

- Si no se dispone de histórico de valores, los métodos cromatográficos deberían superar un valor Cm de 0,97 para que ser aceptables. Los métodos no cromatográficos deberían superar un valor Cm de 0,95.

Pendiente

La pendiente es la tangente del ángulo de la línea recta con el eje horizontal (X) y es una forma de evaluar la sensibilidad de la respuesta obtenida.

- Si se dispone de un histórico de valores de la pendiente, se debería establecer como criterio de aceptación la media de las pendientes de la serie de curvas disponibles menos $t_{Student}$ veces la desviación típica de estas pendientes, como límite inferior, y la media de las pendientes de la serie de rectas disponibles más $t_{Student}$ veces la desviación típica correspondiente a estas pendientes, como límite superior ($t_{Student}$ obtenida a partir del número de valores utilizados).

$$\overline{Slope} - (t_{student} \times SD_{\overline{Slope}}) \leq Slope_{current} \leq \overline{Slope} + (t_{student} \times SD_{\overline{Slope}})$$

Controles de calidad para los puntos en la curva de calibración

En lugar de una curva de trabajo diaria, es posible utilizar una curva de calibración durante un período de hasta tres meses. En ese caso, para las determinaciones diarias durante ese período, deben comprobarse como mínimo dos puntos de la curva, uno en el rango bajo y otro en el alto, antes de comenzar la serie de trabajo.

- Si se dispone de validación de método, el resultado obtenido para estos controles de la curva debe estar comprendido entre los valores aceptables derivados de la validación para el punto en cuestión.
- Si se dispone de un histórico de pendientes pero no de validación de método, el resultado obtenido debe estar comprendido en el intervalo

$$X_{punto} \pm (t_{Student} \times SD_{punto})$$

donde

X_{punto} es el valor medio obtenido para la lectura del punto

SD_{punto} es la desviación típica para los valores obtenidos para la lectura del punto

$t_{Student}$ se obtiene a partir del número de datos empleado para obtener SD_{punto} .

- Si se dispone de una estimación de la reproducibilidad del método, pero no de un histórico de pendientes, el resultado obtenido debe encontrarse en el intervalo

$$V_{\text{punto}} \pm (t_{\text{Student}} \times SD_{\text{repro}})$$

donde

V_{punto} es el valor obtenido para el punto de control de la curva

SD_{repro} es la desviación típica estimada en la reproducibilidad

t_{Student} se obtiene a partir del número de valores utilizados para obtener SD_{repro} .

2.1.5. Análisis de blancos de ensayo

Antes de comenzar la tanda de ensayos diarios, se debería llevar a cabo el análisis de un blanco de ensayo inicial.

Si se dispone de validación de método, el resultado obtenido para el blanco debería ser inferior a los valores obtenidos para el límite de detección correspondiente al método estimado en la validación.

Si no se dispone de validación de método, pero se dispone de un histórico de lecturas de blanco, se debería establecer como criterio de aceptación del blanco el que la señal obtenida no exceda el valor de la media para la serie de valores de los blancos en más de tres veces la desviación típica correspondiente a dichos valores.

Si no se dispone de un histórico de lecturas de blancos, pero sí de una serie de medidas de muestras que presenten muy baja concentración del analito de interés, el criterio de aceptación del blanco debería consistir en que la señal obtenida no supere el valor de tres veces la desviación típica obtenida para estas muestras de concentración muy baja.

Si la primera medida del blanco inicial no cumple los criterios de aceptación, se debe limpiar el sistema. Tras la limpieza, se medirá un nuevo blanco de ensayo. Habrá que repetir este proceso hasta que se obtenga un valor aceptable. Una vez obtenido dicho valor, se debe realizar una segunda lectura de blanco con el fin de confirmar la validez del resultado. Así pues, si no se obtiene un valor aceptable de blanco tras la medida inicial del mismo, será necesario obtener dos medidas sucesivas que cumplan los criterios de aceptación para poder proceder con la rutina del ensayo.

Se debería medir un blanco de ensayo cada cinco muestras, como mínimo, utilizando los mismos criterios aplicados a los blancos iniciales.

Si la programación de la serie de muestras es automática y los resultados se recogen al final de la serie, puede que sea necesario aumentar el número de repeticiones del blanco para asegurar una lectura correcta (por ejemplo, tres repeticiones consecutivas en lugar de una).

Con el objeto de asegurar la limpieza del sistema, se debería medir una serie de repeticiones del blanco (por ejemplo, tres) una vez completada la serie de muestras.

2.1.6. Duplicado de muestras

Se debe repetir 1 muestra de cada 10 en distintos momentos de la serie. Si la muestra se analiza por duplicado o triplicado, esta repetición debería consistir en volver a analizar de nuevo por duplicado o triplicado. Se deben comparar los resultados entre sí.

- Si se dispone de validación de método, los resultados deben cumplir los criterios de reproducibilidad obtenidos en la validación.
- Si no se dispone de validación de método, se aplicará un índice de compatibilidad:

$$IC = \frac{|x_1 - x_2|}{\sqrt{(2SD_1)^2 + (2SD_2)^2}}$$

Fuente: Guía ISO/IEC 43-1:2007

donde

x_1 y x_2 representan los valores medios obtenidos en cada repetición de la muestra; y SD_1 y SD_2 , las desviaciones típicas obtenidas para los duplicados y triplicados, etc., de cada una de las repeticiones.

- Si la muestra se repite utilizando un solo análisis en lugar de por duplicado o triplicado, para considerar aceptable el resultado se debe establecer una desviación máxima para cada muestra respecto a la media, por ejemplo, un máximo del 10% del valor medio.

2.1.7. Controles de calidad

El laboratorio debe realizar controles de calidad de al menos cuatro puntos del rango de ensayo: alto, medio, bajo y límite de cuantificación. Estos puntos de control de ensayo deben ser distintos de los puntos de control de la curva.

Se debe introducir aleatoriamente uno de estos controles de calidad cada cinco muestras, de manera que se asegure que todos ellos han sido analizados suficientemente a lo largo del desempeño de las operaciones del laboratorio. En todo caso, y siempre que los valores de todas las muestras que se van a analizar se encuentren dentro de un rango muy estrecho, el control de calidad se puede repetir en el punto más próximo a ese rango de muestras.

- Si se dispone de validación de método, los resultados deben cumplir los criterios correspondientes a los puntos del control de calidad obtenidos en la validación.

Si no se dispone de validación pero se cuenta con un histórico de resultados asociados a los distintos puntos de control, debería establecerse como criterio de aceptación que el valor del control de calidad esté comprendido en el intervalo

$$X_{\text{punto}} \pm (t_{\text{Student}} \times SD_{\text{punto}})$$

donde

X_{punto} es el valor medio obtenido para la lectura del punto de control;

SD_{punto} es la desviación típica de los valores obtenidos tras la lectura del punto de control; y

t_{Student} : se obtiene a partir del número de valores utilizados.

- Si no se dispone de histórico de resultados, se debe establecer una desviación máxima de cada una de las muestras respecto a la media (por ejemplo, un máximo del 10% del valor medio), para dar por aceptable el resultado.

Muestras ciegas

El laboratorio debe organizar ensayos con muestras ciegas al menos una vez al año. Para ello, el responsable técnico debe preparar muestras de una concentración determinada, pero desconocida para el laboratorio, para su análisis. La muestra ciega puede prepararse a partir de patrones certificados, de restos de muestras de ejercicios de intercomparación o de muestras bien caracterizadas.

- Si se dispone de un proceso de validación de método, el valor verdadero de la muestra debe caer en el intervalo

$$V_{\text{MCiega}} \pm I_{\text{ensayo}}$$

donde

V_{MCiega} es el valor obtenido en el análisis de la muestra ciega; y

I_{ensayo} es la incertidumbre expandida obtenida en la validación del método.

- Si no se dispone de validación de método, pero se dispone de valores de reproducibilidad para el método, el valor verdadero de la muestra debe caer en el intervalo

$$V_{MCiega} \pm (t_{Student} \times SD_{Repro})$$

donde

V_{MCiega} es el valor obtenido tras el análisis de la muestra ciega;

SD_{Repro} es el valor obtenido para la desviación típica de la reproducibilidad; y

$t_{Student}$ se obtiene a partir del número de valores utilizados para obtener SD_{Repro} .

- Si no se dispone de otros valores, se debe establecer una desviación máxima respecto al valor verdadero para aceptar el resultado. Esta desviación puede estimarse a partir de la bibliografía o la experiencia del laboratorio con métodos o analitos similares.

2.2. Controles de calidad externos

Las comparaciones interlaboratorios¹ se utilizan de manera generalizada con diversos propósitos a escala nacional, regional y mundial. Entre los propósitos típicos se incluyen los siguientes:

- evaluar el desempeño de los laboratorios para llevar a cabo ensayos o medidas específicas o y realizar un seguimiento del desempeño de los laboratorios a lo largo del tiempo;
- identificar problemas de los laboratorios e iniciar acciones para la mejora que, por ejemplo, pueden estar relacionadas con unos procedimientos inadecuados de ensayo o medida, la capacitación o supervisión ineficaz del personal o la calibración de los equipos;
- determinar la eficacia y comparabilidad de los métodos de ensayo o medida;
- proporcionar confianza adicional a los clientes de los laboratorios;
- identificar las diferencias entre laboratorios;
- instruir a los laboratorios participantes sobre la base de los resultados de dichas comparaciones;
- validar las estimaciones de incertidumbre declaradas;
- evaluar las características de funcionamiento de un método;
- asignar valores a los materiales de referencia y evaluar su idoneidad para su utilización en procedimientos de ensayo o medida específicos;
- apoyar las declaraciones de equivalencia de las medidas de los institutos nacionales de metrología a través de comparaciones clave y complementarias llevadas a cabo en nombre de la Oficina Internacional de Pesos y Medidas y las organizaciones de metrología asociadas.

Los procedimientos descritos a continuación se aplican principalmente a los laboratorios que organizan estudios de intercomparación, como los laboratorios de referencia nacionales. Asimismo, son totalmente aplicables a los participantes en comparaciones entre laboratorios².

Las pruebas de aptitud³ conllevan el uso de comparaciones entre laboratorios con el fin de determinar su desempeño, tal y como se indicó en los puntos de i) a vii). Las pruebas de aptitud normalmente no se ocupan de los propósitos viii), ix) y x), ya que se asume que los laboratorios son competentes en tales aplicaciones. No obstante, se pueden utilizar para obtener demostraciones independientes de la competencia de un laboratorio.

¹ Comparación entre laboratorios: organización, desempeño y evaluación de medidas con elementos idénticos o similares por dos o más laboratorios conforme a condiciones predeterminadas.

² Participante: un laboratorio, organización o persona que recibe los elementos del ensayo de aptitud y facilita los resultados para que el proveedor del ensayo de aptitud los examine.

³ Ensayo de aptitud: evaluación del desempeño de los participantes respecto a criterios previamente establecidos mediante comparaciones entre laboratorios.

Los pasos previos al ejercicio de intercomparación están relacionados con:

- la asignación de valor a la muestra;
- la determinación del parámetro de desviación típica correspondiente a la prueba de aptitud, que a continuación se necesitará en los cálculos del ejercicio;
- la determinación del número de repeticiones que cada participante debe realizar; y
- la confirmación de la validez de la muestra que se va a analizar mediante pruebas de homogeneidad y estabilidad de la misma. El organizador del ejercicio debe calcular estos parámetros.

Antes de enviar las muestras a los distintos participantes, el organizador debe elaborar una serie de instrucciones detalladas y documentadas.

Como es obvio, es obligación del organizador realizar un análisis de la cantidad de muestra requerida para llevar a cabo el ejercicio, teniendo en cuenta el número de participantes, las pruebas de homogeneidad y estabilidad necesarias y la posibilidad de repetición, pérdida o daño de las muestras durante la fase de transporte. Por tanto, es conveniente estimar una cantidad que exceda las necesidades estrictamente calculadas.

2.2.1. Asignación del valor a la muestra

Antes de realizar el ejercicio, se deben definir los criterios utilizados para obtener el valor con el que se compararán los resultados enviados por los laboratorios. Dichos criterios se describen a continuación.

- El valor correspondiente a un material de referencia certificado o muestra enriquecida se obtiene cuando:
 - se utiliza una muestra de material de referencia certificado para la prueba de aptitud; es preciso conocer el valor de la propiedad y la incertidumbre de este valor
 - se utiliza una muestra original enriquecida con cantidades de la sustancia a determinar; el organizador puede efectuar el enriquecimiento o puede encargarse el laboratorio participante con soluciones concentradas suministradas por el organizador.
- El resultado se deriva del valor medio obtenido por un grupo de laboratorios expertos que han analizado la muestra o muestras, utilizando métodos de ensayo aceptados previamente y que pueden considerarse métodos “absolutos” o “de referencia”. Los resultados atípicos deben eliminarse antes de calcular la media.
- El resultado se obtiene como el valor medio de los obtenidos por el conjunto de laboratorios participantes, tras la eliminación de los valores atípicos o como la media obtenida con métodos estadísticos robustos (como el algoritmo A; véase más adelante). Este sistema entraña más riesgos en los esquemas de comparación de acceso libre, ya que los datos erróneos pueden afectar a la media, lo que significa que se deben eliminar eficazmente los valores atípicos.

2.2.2. Determinación de la desviación típica para las pruebas de aptitud $\hat{\sigma}$ ⁴

La asignación del valor de la desviación típica para las pruebas de aptitud se puede realizar de varias maneras.

Valor prescrito

La desviación típica para las pruebas de aptitud puede asignarse a partir del cumplimiento de valores normativos. Este método tiene la ventaja de adecuarse al propósito del método de la mejor manera posible.

⁴ Desviación típica para los ensayos de aptitud: la medida de la dispersión utilizada para evaluar los resultados de un ensayo de aptitud a partir de la información disponible..

Valor percibido

La desviación típica para las pruebas de aptitud puede establecerse a partir de la experiencia previa del coordinador y sus colaboradores, a partir de valores obtenidos en el pasado.

Cuando la desviación típica para las pruebas de aptitud ($\hat{\sigma}$) se obtiene mediante prescripción o percepción, existe la posibilidad de que el valor seleccionado no sea realista en relación con la reproducibilidad del método de medida. Para determinar que el valor de $\hat{\sigma}$ se corresponde con los valores de repetibilidad y reproducibilidad obtenidos con el método se puede realizar la siguiente prueba:

σ_R es la desviación típica de la reproducibilidad, y

σ_r es la desviación típica de la repetibilidad.

La desviación típica entre laboratorios se calcula con la fórmula:

$$\sigma_L = \sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2}$$

A continuación, el valor del factor ϕ se calcula mediante la sustitución de los valores de σ_L y σ_r y el valor seleccionado para $\hat{\sigma}$ en la ecuación siguiente:

$$\hat{\sigma} = \sqrt{(\phi \times \sigma_L)^2 + \left(\frac{\sigma_r^2}{n}\right)}$$

donde

n es el número de réplicas que realizará cada laboratorio.

Si el valor obtenido para ϕ es inferior a 0,5, el valor seleccionado para $\hat{\sigma}$ corresponde a un nivel de reproducibilidad que los laboratorios no serán capaces de alcanzar en la práctica, por lo que habrá que aumentar el valor.

Valor a partir en un modelo general

El valor de la desviación típica para las pruebas de aptitud puede derivarse del valor de reproducibilidad obtenido para el método de medida.

Por ejemplo, Horowitz propone el siguiente modelo para la evaluación de la desviación típica de la reproducibilidad a partir de la concentración:

$$\sigma_R = 0,02 c^{0,8495}$$

donde c es la concentración de la medida a determinar, que se especificará en forma de porcentaje (porcentaje en peso).

Valor a partir en los resultados de repetibilidad y reproducibilidad

Cuando se dispone de valores para la desviación típica de la reproducibilidad y la repetibilidad, se puede obtener la desviación típica para las pruebas de aptitud de la siguiente manera:

σ_R es la desviación típica de la reproducibilidad, y

σ_r es la desviación típica de la repetibilidad.

La desviación típica entre laboratorios se calcula como:

$$\sigma_L = \sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2}$$

El valor de $\hat{\sigma}$ se calcula como

$$\hat{\sigma} = \sqrt{\sigma_L^2 + \left(\frac{\sigma_r^2}{n}\right)}$$

donde

n es el número de réplicas que realizará cada laboratorio.

Valor a partir de los datos obtenidos en una ronda de pruebas de aptitud

El valor de la desviación típica para las pruebas de aptitud se puede obtener a partir del valor derivado de los resultados reportados por los participantes en esta ronda de ensayos. La desviación típica debe ser la desviación típica robusta correspondiente a los resultados reportados por todos los participantes, calculada mediante la aplicación del algoritmo A:

Ordenar los p datos en orden ascendente:

$x_1, x_2, \dots, x_i, \dots, x_p$

Ordenar las medias robustas y las desviaciones típicas robustas de estos datos (x^* y s^*).

Los valores iniciales de x^* y s^* son:

$x^* = \text{mediana de } x_i \quad (i = 1, 2, \dots, p)$

$s^* = 1,483 \text{ mediana de } |x_i - x^*| \quad (i = 1, 2, \dots, p)$

Actualizar los valores de x^* y s^* de la siguiente manera. Calcular:

$\delta = 1,5 s^*$

Para cada x_i ($i = 1, 2, \dots, p$), calcular:

$$x_i^* = \begin{cases} x^* - \delta, & \text{si } x_i < x^* - \delta \\ x^* + \delta, & \text{si } x_i > x^* + \delta \\ x_i, & \text{para otro} \end{cases}$$

Ahora, volver a calcular los valores nuevos para x^* y s^* con la fórmula:

$$x^* = \sum \frac{x_i^*}{p}$$

$$s^* = 1,134 \sqrt{\frac{\sum (x_i^* - x^*)^2}{(p - 1)}}$$

Donde el sumatorio es sobre i .

La estimación robusta de x^* y s^* se deriva de un cálculo iterativo hasta la convergencia del proceso. Se asume la convergencia cuando no se producen cambios entre una iteración y la siguiente, en la tercera cifra significativa de la desviación típica robusta y de la cifra equivalente de la media robusta. Se puede programar un ordenador para aplicar este método.

2.2.3. Criterios para la selección del número de medidas que se llevarán a cabo en cada uno de los laboratorios participantes

Las variaciones en la repetibilidad del método contribuyen a que aparezcan sesgos en las pruebas de aptitud. Cuando la variación en la repetibilidad es demasiado alta en comparación con la desviación típica para las pruebas de aptitud, existe el riesgo de que los resultados obtenidos no sean fiables. En tales circunstancias, un laboratorio puede presentar un factor de sesgo muy alto en una ronda, pero no en otra, lo que dificultaría el descubrimiento de la causa.

Si se desea limitar la influencia de las variaciones en la repetibilidad, el número de réplicas (n) realizadas por cada laboratorio debe elegirse de modo que:

$$\frac{\sigma_r}{\sqrt{n}} \leq 0,3 \hat{\sigma}$$

donde

σ_r es la desviación típica de la repetibilidad establecida antes del ejercicio (ya sea por medio de un ejercicio experimental entre laboratorios o determinada por el laboratorio organizador).

Si se cumple esta condición, la desviación típica de la repetición no representa más del 10% de la desviación típica para los ensayos de aptitud.

Además, todos los laboratorios que participen en la intercomparación deben realizar el mismo número de réplicas.

2.2.4. Procedimiento para el ensayo de homogeneidad⁵

Cuando sea aceptable no llevar a cabo ensayos de homogeneidad para todos los mesurandos, se seleccionará un método de medida y un mensurando característico, suficientemente sensibles a la heterogeneidad de las muestras.

Las muestras para una ronda de ensayo de aptitud se prepararán y envasarán asegurándose de que hay material suficiente para realizar tanto la prueba de aptitud como las pruebas de homogeneidad.

Se seleccionará aleatoriamente un número (g) de muestras ya envasadas, donde $g \geq 10$. Es posible reducir el número de muestras incluidas en la prueba de homogeneidad si se dispone de datos previos sobre estas pruebas de homogeneidad realizadas con los mismos procedimientos.

Se prepararán dos porciones de ensayo para cada muestra, minimizando en la medida de lo posible las diferencias intraensayo.

Se toman de manera aleatoria 2 g de estas porciones de ensayo y se analiza cada una de ellas, completando la serie de ensayos en condiciones de repetibilidad.

Calcular la media (\bar{x}), la desviación típica dentro de la muestra (s_w) y la desviación típica entre muestras (s_b) de la siguiente manera:

Los datos para una prueba de homogeneidad se representan con $x_{t,k}$

donde

t representa la muestra ($t = 1, 2, \dots, g$) y

k , la porción de la muestra ($k = 1, 2$).

El promedio para cada muestra se define como:

$$x_{t..} = \frac{x_{t,1} + x_{t,2}}{2}$$

⁵ De acuerdo a la norma 13528:2005 de la Organización Internacional de Normalización.

y el intervalo de las porciones entre-ensayos como:

$$w_t = |x_{t,1} - x_{t,2}|$$

La media general se calcula como:

$$\bar{x}_{..} = \sum \bar{x}_{t.} / g$$

La desviación típica de la media general se calcula con:

$$s_x = \sqrt{\sum (x_{t.} - \bar{x}_{..})^2 / (g - 1)}$$

La desviación típica entre muestras se calcula como:

$$s_w = \sqrt{\sum w_t^2 / (2g)}$$

donde el sumatorio comprende todas las muestras ($t = 1, 2, \dots, g$).

Por último, para calcular la desviación típica entre muestras:

$$s_s = \sqrt{s_x^2 - (s_w^2 / 2)}$$

Criterios de evaluación para las pruebas de homogeneidad

Se comparará la desviación típica entre muestras (s_s) con la desviación típica requerida para las pruebas de aptitud ($\hat{\sigma}$). Las muestras cumplen un criterio adecuado de homogeneidad si:

$$s_s \leq 0,3 \hat{\sigma}.$$

Si se cumple este criterio, la desviación típica entre muestras no representa más del 10% de la desviación típica general para las pruebas de aptitud. Si no se cumple dicho criterio, el coordinador debe considerar una de las siguientes posibilidades:

- Examinar el método utilizado para preparar las muestras con el fin de realizar las mejoras necesarias.
- Distribuir una serie de muestras a cada participante en el ejercicio de comparación con el fin de medir cada muestra. La heterogeneidad de estas muestras aumentará la desviación típica entre muestras a un valor:

$$\sigma_{r1} = \sqrt{\sigma_r^2 + s_s^2}$$

Este valor σ_{r1} se puede utilizar para aumentar el número de réplicas de cada participante en el ejercicio.

- Incluir la desviación típica entre muestras en la desviación típica de las pruebas de aptitud, calculando $\hat{\sigma}$ como

$$\hat{\sigma} = \sqrt{\hat{\sigma}_1^2 + s_s^2}$$

donde

$\hat{\sigma}_1$ es la desviación típica de la prueba de aptitud sin incluir tolerancia alguna para la heterogeneidad de las muestras.

2.2.5. Procedimiento para la prueba de estabilidad

Las pruebas de estabilidad debe realizarlas el mismo laboratorio que lleve a cabo la prueba de homogeneidad. Se deben utilizar el mismo método y producto que los empleados en las pruebas de homogeneidad.

Las pruebas de estabilidad se llevarán a cabo después de las pruebas de homogeneidad. El período entre unas y otras debe ser similar al tiempo que transcurrirá, según las estimaciones, entre la preparación de las muestras para el ejercicio de intercomparación y el plazo máximo de presentación de resultados de los participantes.

Tomar un número g de muestras, donde $g \geq 3$.

Se prepararán dos porciones de ensayo para cada muestra, según lo descrito anteriormente para las pruebas de homogeneidad.

Se tomarán de manera aleatoria las porciones de 2g para obtener un resultado de medida $y_{t,k}$ para cada muestra, realizándose todas las medidas en condiciones de repetibilidad.

Calcular la media \bar{y} (..) de todas las medidas.

Criterios de evaluación para la prueba de estabilidad

Se comparará la media obtenida en la prueba de homogeneidad con la media derivada de la prueba de estabilidad. Las muestras se considerarán estables si:

$$|\bar{x}_{..} - \bar{y}_{..}| \leq 0,3 \hat{\sigma}$$

Si no se cumple este criterio, se evaluará la preparación y el almacenamiento de la muestra para mejorarlos si fuera posible.

2.2.6. Instrucciones dirigidas a los participantes

Antes de enviar los elementos de la prueba de aptitud, el proveedor de la prueba notificará con suficiente antelación a los participantes la fecha de recepción prevista de los elementos y el plazo en que los laboratorios participantes deben entregar los resultados.

El proveedor de la prueba de aptitud debe facilitar a todos los participantes instrucciones detalladas y documentadas, que incluirán información sobre:

- la necesidad de tratar los elementos de la prueba de aptitud de la misma manera que la mayoría de muestras que se analizan rutinariamente, a menos que los requisitos específicos del programa exijan la desviación de este principio;
- las condiciones de almacenamiento;
- los métodos de ensayo que se deben utilizar o están permitidos, cuando corresponda;
- el procedimiento para la preparación y acondicionamiento de los elementos de la prueba de aptitud;
- las instrucciones relativas a la manipulación, incluidos los requisitos de seguridad;
- las condiciones ambientales específicas bajo las que debe realizarse la prueba de aptitud y, si en caso necesario, las instrucciones para que los participantes informen de las condiciones ambientales pertinentes durante la medida;
- instrucciones específicas sobre la presentación de los resultados (unidades de medida, número de cifras significativas o de decimales) y sobre la incertidumbre del resultado, si se requiere. En este último caso, se debería incluir el factor de cobertura y, si es posible, la probabilidad de dicha cobertura;
- la fecha límite para la entrega de los resultados;

- la información de contacto del proveedor en caso de que sea necesario realizar alguna consulta; y
- las instrucciones relativas a la devolución de los elementos de la prueba de aptitud, si corresponde.

2.2.7. Cálculo de los parámetros estadísticos asociados con los resultados de la prueba de aptitud

Estimación del sesgo de los participantes

Si x es el resultado (o la media de resultados) reportados por un participante para la medida de uno de los parámetros que van a determinar en una ronda de una prueba de aptitud, el sesgo (D) se puede calcular como:

$$D = x - X$$

donde

X : el valor asignado.

Si un participante obtiene un resultado con un sesgo superior a $3,0 \hat{\sigma}$ o inferior a $-3,0 \hat{\sigma}$, el resultado se considerará y marcará como una “señal de acción”. De la misma manera, si un participante obtiene un resultado con un sesgo superior a $2,0 \hat{\sigma}$ o inferior a $-2,0 \hat{\sigma}$, el resultado se considerará y marcará como una “señal de advertencia”.

Una “señal de acción” o dos “señales de advertencia” consecutivas indican que el laboratorio debe iniciar una investigación del sesgo observado en sus resultados.

Diferencias porcentuales

Si x es el resultado (o la media de resultados) indicados por un participante en la medida de uno de los parámetros que se van a determinar mediante una ronda de una prueba de aptitud, la diferencia porcentual ($D\%$) se puede calcular como:

$$D\% = 100 (x - X)/X$$

donde

X representa el valor asignado.

Si un participante obtiene un resultado con una diferencia porcentual superior a $300 \hat{\sigma}/X\%$ o inferior a $-300 \hat{\sigma}/X\%$, el resultado se considerará y marcará como una “señal de acción”. De igual manera, si un participante obtiene un resultado con una diferencia porcentual superior a $200 \hat{\sigma}/X\%$ o inferior a $-200 \hat{\sigma}/X\%$, el resultado se considerará y marcará como una “señal de advertencia”.

Una “señal de acción” o “dos señales de advertencia” consecutivas indican que el laboratorio debe iniciar una investigación del sesgo observado en sus resultados.

2.2.8. z-score

El valor z-score se calcula con la fórmula:

$$z = \frac{(x - X)}{\hat{\sigma}}$$

donde

x es el valor reportado por el participante,

X es el valor asignado, y

$\hat{\sigma}$ es la desviación típica para las pruebas de aptitud.

Si un participante obtiene un resultado con un z-score superior a $3,0 \hat{\sigma}$ o inferior a $-3,0 \hat{\sigma}$, el resultado se considerará y marcará como una “señal de acción”. De igual manera, si un participante obtiene un resultado con un z-score superior a $2,0 \hat{\sigma}$ o inferior a $-2,0 \hat{\sigma}$, el resultado se considerará y marcará como una “señal de advertencia”.

Si el número de participantes en la prueba de aptitud es reducido (por ejemplo, menos de 10 laboratorios), se debe considerar detenidamente el significado del z-score en las rondas individuales. En tales casos, es preferible valorar la combinación de resultados en distintas rondas para valorar el desempeño de cada laboratorio.

2.2.9. Número E_n

Este parámetro se calcula como:

$$E_n = \frac{x - X}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{ref}^2}}$$

donde

X es el valor asignado.

U_{ref} es la incertidumbre expandida de X.

U_{lab} es la incertidumbre expandida de x, el resultado obtenido por el participante.

Un valor superior a 1,0 o inferior a -1,0 equivale a un z-score por encima o por debajo de 2,0, respectivamente. Por tanto, un resultado de este tipo debe tratarse según lo especificado en la evaluación del valor z-score.

2.2.10. z'-score

El valor z'-score se calcula con la siguiente fórmula:

$$z' = \frac{(x - X)}{\sqrt{\hat{\sigma}^2 + u_x^2}}$$

donde

u_x es la incertidumbre (no expandida) del valor asignado X.

Los resultados de z'-score se interpretan igual que los valores de z-score.

La comparación de los valores z-score y z'-score demuestra que los valores z'-score en una ronda pueden ser inferiores a los valores correspondientes de z-score, de acuerdo a un factor constante de

$$\frac{\hat{\sigma}}{\sqrt{\hat{\sigma}^2 + u_x^2}}$$

si

$$0,96 \leq \frac{\hat{\sigma}}{\sqrt{\hat{\sigma}^2 + u_x^2}} \leq 1,00$$

Entonces, z'-score se aproximará a z-score, y en consecuencia, se podrá concluir que la incertidumbre del valor asignado es despreciable.

2.2.11. Zeta-score (ζ)

Este parámetro solo se puede utilizar si el valor asignado a la prueba de aptitud no se ha calculado a partir de los resultados de los laboratorios participantes.

$$zeta\ score = \frac{(x - X)}{\sqrt{u_x^2 + u_X^2}}$$

donde

u_x es el valor de la incertidumbre típica (no expandida) estimada por el laboratorio participante,
y

u_X es la incertidumbre típica (no expandida) del valor asignado X.

La interpretación de zeta-score (ζ) es similar a la de z-score.

Si un participante obtiene valores sucesivos de zeta-score (ζ) superiores a 3,0, esto puede indicar que está subestimando las fuentes de incertidumbre.

Si un laboratorio presenta un sesgo muy alto y el intervalo de incertidumbre $X \pm U_X$ no incluye el valor asignado, se obtendrán también valores muy elevados para zeta-score (ζ).

2.2.12. Valor E_z

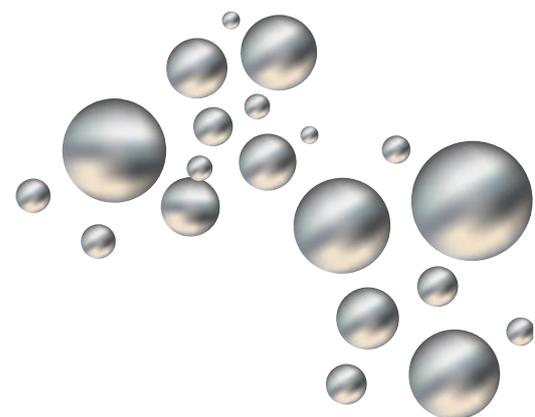
El valor E_z se define como

$$E_{z-} = \frac{x - (X - U_X)}{U_x}$$

$$E_{z+} = \frac{x - (X + U_X)}{U_x}$$

En estos casos se utiliza la incertidumbre expandida.

- Si ambos valores (E_{z-} y E_{z+}) caen en el intervalo de -1,0 a 1,0, el resultado se considera satisfactorio.
- Si uno de los dos valores E_z cae fuera del intervalo de -1,0 a 1,0, se obtendrá un resultado cuestionable.
- Si ambos valores son inferiores a -1,0 o superiores a 1,0, el resultado es insatisfactorio.



3. Evaluación de la aptitud de los laboratorios

Todos los laboratorios pueden evaluar su desempeño mediante la lista de verificación del anexo 3, que incluye una serie de preguntas organizadas por secciones con el propósito de recopilar datos sobre los laboratorios y los criterios que se aplican a la evaluación. A tal fin, se debe recoger información sobre los equipos, el nivel de conocimientos, la experiencia de participación en estudios de intercomparación y en relación a la acreditación.



4. Referencias y bibliografía

Referencias

1. National Research Council of the National Academies. *Human biomonitoring for environmental chemicals*. Washington (DC): National Academies Press; 2006. <https://www.nap.edu/catalog/11700/human-biomonitoring-for-environmental-chemicals>
2. Calafat A. M., Needham L. L. “What additional factors beyond state-of-the-art analytical methods are needed for optimal generation and interpretation of biomonitoring data?” *Environ Health Perspect.* 2009;117:1481-5.
3. Cornellis R., Heinzow B., Herber R. F. M., Christensen J. M., Poulsen O. M., Sabbioni E. et al. “Sample collection guidelines for trace elements in blood and urine”. *Pure and Applied Chemistry.* 1995;67(8-9):1575-608.
4. Final Report Summary - COPHES (Iniciativa europea para la coordinación de la vigilancia biológica humana). Bruselas: Comisión Europea, Servicio de Información Comunitario sobre Investigación y Desarrollo (CORDIS); 2013. Disponible en https://cordis.europa.eu/result/rcn/58554_es.html (consultado el 28 de febrero de 2018).
5. Melia J. L. Valencia: Unidad de Investigación de Psicometría de la Universidad de Valencia; 2009. Disponible en <http://www.uv.es/meliaj/Docencia/Tablas/TablaR.PDF> (consultado el 28 de febrero de 2018)..

Bibliografía

Organización Internacional de Normalización [sitio web]. Ginebra: Organización Internacional de Normalización (ISO); 2018. Disponible en <https://www.iso.org/standards-catalogue/browse-by-ics.html> (consultado el 31 de enero de 2018).

ISO/IEC 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.

ISO/IEC Guide 43-1:1997. Proficiency testing by interlaboratory comparisons – Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes.

ISO/IEC Guide 43-2:1997. Proficiency testing by interlaboratory comparisons – Part 2: Selection and use of proficiency testing schemes by laboratory accreditation bodies.

ISO 13528. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons.

ISO Guide 33, segunda edición. Reference materials. Good practice in using reference materials.

G-ENAC-99; segunda edición. Cuestionario de autoevaluación de cumplimiento de la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 para laboratorios. Madrid: Entidad Nacional de Acreditación; 2018. Disponible en <https://www.enac.es/> (consultado el 7 de febrero de 2018).

Anexo 1. Registro de recepción de muestras

1. ORIGEN DE LA MUESTRA:

Centro:
Ciudad/país:
Fecha de recogida de la muestra:

2. MUESTRA RECIBIDA:

- Orina
 Cabello Sangre de cordón umbilical

Firma del revisor:

3. RECEPCIÓN DE MUESTRA:

Fecha
(dd/mm/aa)

Hora
(hh:mm)

A) EMBALAJE

- NINGÚN PROBLEMA DETECTADO
 PROBLEMAS DETECTADOS:
 Embalaje dañado
 Agentes refrigerantes descongelados
 Otros: _____

B) MUESTRAS

- NINGÚN PROBLEMA DETECTADO
 PROBLEMAS DETECTADOS:
 Muestra derramada/recipiente roto
 Cantidad o volumen insuficientes (especificar la matriz)___
 Discrepancia en los códigos de ID
 Otros: _____

C) DOCUMENTOS

- NINGÚN PROBLEMA DETECTADO
 PROBLEMAS DETECTADOS:
 Falta el registro de toma de muestras
 Falta el cuestionario para la toma de muestras de cabello
 Falta el cuestionario para la toma de muestras de orina
 Falta el cuestionario para la toma de muestras de sangre de cordón umbilical
 Falta el cuestionario del estudio
 Discrepancia en los códigos de ID
 Otros: _____

4. FECHA DE ALMACENAMIENTO O DEPÓSITO EN BIOBANCO:

5. COMENTARIOS:

CÓDIGOS DE ID PARA MUESTRAS RELACIONADAS

Orina Cabello Sangre de cordón umbilical

Anexo 3. Autoevaluación de la competencia de los laboratorios

Cuestionario de evaluación del laboratorio

INFORMACIÓN GENERAL

1. Datos de la persona que cumplimenta el cuestionario.

Nombre:

Cargo:

Empresa:

Dirección:

Ciudad:

Código postal:

País:

Correo electrónico:

Teléfono:

2. ¿Qué análisis se llevan a cabo en su laboratorio?

Mercurio en cabello Mercurio en orina Mercurio en sangre de cordón umbilical

3. ¿Qué técnica(s) analítica(s) utiliza?

.....

4. Por favor indique el tipo, fabricante y modelo de los instrumentos de análisis

.....

5. ¿Cuál es la cantidad mínima de cabello/orina/sangre requerida para las medidas? mg o mL

.....

INFORMACIÓN SOBRE EL MÉTODO

6. ¿Está acreditado el procedimiento analítico para el análisis de mercurio en cabello/ orina/ sangre de cordón umbilical?

NO Sí

Si la respuesta es afirmativa, incluya por favor el número de su anexo técnico:

.....

7. ¿Disponen de un procedimiento operativo estándar general para la validación de los métodos analíticos?

NO Sí

8. ¿Existe un procedimiento operativo estándar para el análisis del mercurio en..... en su laboratorio?

NO Sí

9. ¿Disponen de un método validado para el análisis del mercurio en.....?

NO Sí

10. Por favor, complete la siguiente información sobre su método analítico.

Repetibilidad entre series %

Límite de cuantificación.....

Límite de detección

Exactitud.....

Incertidumbre

11. ¿Cómo calcula la repetibilidad entre series?

.....

12. ¿Cómo calcula el límite de cuantificación?

.....

13. ¿Cómo calcula el límite de detección?

.....

14. ¿Cómo calcula la exactitud?

.....

15. ¿Qué componentes utilizan para calcular la incertidumbre?

.....

CONTROL DE CALIDAD

16. ¿Dispone de un sistema de control de calidad interno?

No Sí

17. ¿Aplican los siguientes controles de calidad?

.....

Controles de línea recta ⁶	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <i>Especifique la frecuencia.....</i>
Coeficiente de regresión	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí
Coeficiente de linealidad	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí
Pendiente	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí
Blancos	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <i>Especifique la frecuencia.....</i>
Controles de calidad	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <i>Especifique la frecuencia.....</i>
Muestras ciegas	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <i>Especifique la frecuencia.....</i>
Muestras duplicadas	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <i>Especifique la frecuencia.....</i>

18. ¿Utilizan materiales de referencia certificados?

No Sí *Especifique el fabricante y la concentración:*

.....

19. ¿Utilizan materiales de referencia?

No Sí *Especifique el fabricante y la concentración:*

.....

20. ¿Utilizan equipos calibrados o verificados?

No Sí

21. ¿Disponen de un plan y programa anual de calibración de los equipos?

No Sí

22. ¿Disponen de registros de las condiciones de almacenamiento de las muestras, cuando es necesario?

No Sí *Especifique el fabricante y la concentración:*

23. ¿Participan en un programa anual de comparación entre laboratorios?

No Sí

⁶ Relacionado con la frecuencia de calibración, se emplean para confirmar que los parámetros de la recta cumplen los criterios de validación definidos.

24. ¿Con qué frecuencia participan? (Indicar el organizador y el número de rondas al año)

.....

25. La evaluación de sus resultados en la intercomparación está basada en:

- | | | |
|--------------|-----------------------------|--|
| z-score | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> Sí |
| Número E_n | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> Sí |
| z'-score | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> Sí |
| zeta-score | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> Sí |
| Valor E_z | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> Sí |
| Otra | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> Sí <i>Especifique</i> |

Criterios de evaluación

Número de pregunta	Explicación
6	<p>SÍ: Los laboratorios acreditados deben considerarse laboratorios expertos; sin embargo, en este caso habrá que contestar afirmativamente a la mayoría del resto de preguntas para que así sea.</p> <p>NO: La aptitud del laboratorio puede estimarse según se responda a las preguntas restantes.</p>
7	<p>SÍ: El primer paso al desarrollar una validación específica debe ser elaborar el borrador del procedimiento general para dicha validación.</p> <p>NO: Si se ha validado el método para la determinación del contenido de mercurio (pregunta 9), puede ser aceptable una aptitud apropiada.</p>
8	<p>SÍ: El segundo paso al desarrollar un proceso de validación específico debe ser elaborar el borrador del procedimiento específico de validación correspondiente al mercurio. Este debe ser el paso inicial en la validación.</p> <p>NO: Si se ha validado el método para la determinación del contenido de mercurio (pregunta 9), puede ser aceptable una aptitud apropiada.</p>
9	<p>SÍ: Un método validado es un paso necesario al evaluar la aptitud del laboratorio. Asimismo, el desempeño del laboratorio se puede considerar suficiente si se contesta de manera apropiada a las preguntas sobre el control de calidad y la pregunta 10 ofrece parámetros estadísticos adecuados.</p> <p>NO: El laboratorio debe ser capaz de validar el método. Como mínimo, es conveniente obtener los parámetros estadísticos de la exactitud y el límite de cuantificación.</p>
10	<p>Estos valores permiten evaluar el desempeño de un laboratorio. Una comparación entre distintos laboratorios permite determinar la fiabilidad de cada uno de ellos.</p>

Número de pregunta	Explicación
11	Esta pregunta permite determinar la aptitud estadística del laboratorio.
12	Esta pregunta permite determinar la aptitud estadística del laboratorio.
13	Esta pregunta permite determinar la aptitud estadística del laboratorio.
14	Esta pregunta permite determinar la aptitud estadística del laboratorio.
15	Esta pregunta permite determinar la aptitud estadística del laboratorio. En este caso particular, es necesario valorar la posibilidad de subestimar la incertidumbre en la medida, ya que esto puede afectar a la capacidad para obtener resultados comparables.
16	SÍ: Es necesario evaluar el alcance de los controles de calidad internos con el fin de asegurar la detección de cualquier desviación. NO: El primer paso para poder confiar en la fiabilidad de los resultados debe ser contar con un sistema de control de calidad interno.
17	SÍ: Aunque no es necesario llevar a cabo todos los controles, la aplicación de un número elevado garantiza mejores resultados. NO: El laboratorio debe procurar ejecutar algunos de los controles, por ejemplo, el control de la recta de calibrado y algún tipo de control de las muestras.
18	SÍ: El uso de material de referencia certificado asegura un valor asignado. Se deben considerar las posibles manipulaciones (diluciones...) con el fin de obtener el valor final real en cada caso. NO: Como mínimo, deben utilizarse materiales de referencia (pregunta 19).
19	SÍ: El laboratorio puede utilizar materiales adecuados siempre que se hayan caracterizado de manera apropiada. NO: Esta pregunta se puede omitir si se contesta afirmativamente a la pregunta 18.
20	SÍ: La calibración del equipo garantiza la repetibilidad instrumental y evita los errores relacionados con el equipo. NO: La calibración es el primer paso en el control de cualquier equipo. No se debe efectuar ninguna medida antes de calibrar el equipo.
21	SÍ: Un plan y programa de calibración anual asegura el correcto funcionamiento de todos los equipos. Se deben llevar a cabo verificaciones intermedias cuando sea necesario. NO: Se debe calibrar todos los equipos antes de llevar a cabo un análisis.
22	SÍ: La trazabilidad de la medida es fundamental para el control adecuado de las condiciones ambientales. NO: Se debe realizar el seguimiento de la temperatura, humedad y otros factores cuando sea necesario. Si no es así, los resultados finales podrían ser poco fiables.
23	SÍ: Los programas de intercomparación anuales ponen de relieve la disposición de los laboratorios y se deben considerar una respuesta favorable. NO: Solo la participación a largo plazo ofrece a los laboratorios una herramienta eficaz para evaluar resultados.

Número de pregunta	Explicación
--------------------	-------------

- | | |
|----|--|
| 24 | Se debe evaluar positivamente la participación prolongada, independientemente de sus resultados. |
| 25 | El valor de z-score puede ser insuficiente para determinar el desempeño del laboratorio. Los métodos adicionales muestran una mayor capacidad del laboratorio. |

El criterio para la evaluación de los laboratorios debe basarse en la información recopilada en las preguntas 6 a 25 del cuestionario. No obstante, este criterio puede variar y puede aplicarse de forma más o menos rigurosa dependiendo de la situación y los requisitos específicos. Teniendo esto en cuenta, se pueden aplicar los siguientes criterios.

- Aquellos laboratorios que respondan negativamente a la pregunta 16 o a la 20, deben ser automáticamente excluidos.
- Los laboratorios con menos de 9 respuestas afirmativas deben mejorar su sistema de control de calidad, por ejemplo, aplicando algunas de las actividades indicadas en la tabla de criterios de evaluación. En especial, todos los participantes deben plantearse el objetivo final de la validación del método, y es muy recomendable obtener los criterios de control de calidad a partir de dicha validación.
- En el caso de los laboratorios con menos de 18 respuestas afirmativas, se debe prestar especial atención a las preguntas de la 10 a la 15 y a la 24, ya que estas permiten evaluar la aptitud y, en consecuencia, ser considerado como laboratorio candidato.
- Una respuesta afirmativa a más de 18 preguntas indica un buen perfil de aptitud de análisis. Por tanto, se puede evaluar al laboratorio como candidato para llevar a cabo el análisis. No obstante, debe participar en los ejercicios de comparación entre laboratorios específicos para el estudio de la OMS.

Procedimiento operativo estándar para la determinación de mercurio en cabello

(toma de muestreo, análisis de mercurio total, interpretación de resultados)

Resumen

Este procedimiento operativo estándar describe el proceso de evaluación de la exposición prenatal al mercurio a través de la vigilancia biológica humana empleando el cabello como matriz biológica. En este documento se detalla el proceso de toma de muestras de cabello, análisis de la concentración de mercurio total e interpretación de los resultados.

Palabras clave

Mercurio: análisis
Compuestos de metilmercurio: análisis
Biomarcadores: análisis
Cabello: química
Exposición materna
Intercambio maternofetal
Bebé, recién nacido
Exposición ambiental

Colaboradores

Argelia Castaño
Centro Nacional de Sanidad Ambiental del Instituto de Salud Carlos III (España)
Marta Esteban
Centro Nacional de Sanidad Ambiental del Instituto de Salud Carlos III (España)
Miguel Ángel Lucena
Centro Nacional de Sanidad Ambiental del Instituto de Salud Carlos III (España)

Índice

Abreviaturas.....	37
Introducción: el cabello humano como matriz para la vigilancia biológica humana del mercurio.....	38
1. Toma de muestras de cabello	39
1.1. Alcance del método.....	39
1.2. Medidas de seguridad.....	39
1.3. Material necesario	39
1.4. Preparación o tratamiento previo del material de toma de muestras.....	40
1.5. Procedimiento para la toma de muestras	41
1.6. Etiquetado	46
1.7. Transporte y conservación de las muestras	46
1.8. Recepción de muestras	46
1.9. Preparación de alícuotas de las muestras	47
1.10. Almacenamiento y conservación	50
1.11. Control de calidad.....	50
2. Análisis de la concentración de mercurio total presente en el cabello	51
2.1. Alcance del método.....	52
2.2. Fundamento teórico	52
2.3. Medidas de seguridad.....	53
2.4. Equipo, materiales y soluciones	53
2.5. Calibración	54
2.6. Procedimiento.....	55
2.7. Control de calidad.....	58
2.8. Evaluación del método.....	59
3. Interpretación de los datos	63
3.1. Valores para la interpretación	64
Referencias	65
Anexo 1. Registro de las muestras de cabello tomadas	68
Anexo 2. Cuestionario de toma de muestras de cabello	69
Anexo 3. Registro de recepción de muestras.....	70
Anexo 4. Lista de verificación previa a la toma de muestras.....	71
Anexo 5. Lista de verificación posterior a la toma de muestras	72

Abreviaturas

CRM	material de referencia certificado
VBH	vigilancia biológica humana
Hg	mercurio
OIEA	Organismo Internacional de Energía Atómica
ID	identificación
LDD	límite de detección
LDC	límite de cuantificación
POE	procedimiento operativo estándar

Introducción: el cabello humano como matriz para la vigilancia biológica humana del mercurio

El organismo puede absorber las sustancias químicas presentes en el medio ambiente e incorporarlas a la composición del cabello. El cabello humano se ha empleado ampliamente en distintas áreas del conocimiento científico, como por ejemplo en ciencia forense, toxicología clínica, salud ocupacional y control antidopaje. En los últimos años, se ha utilizado también en los estudios de vigilancia biológica humana de las sustancias químicas presentes en el medio ambiente. El uso de esta matriz en la vigilancia biológica humana presenta una serie de ventajas, entre otras: es una matriz no invasiva; de fácil muestreo, transporte y conservación; y la obtención de muestras no requiere materiales especiales ni personal sanitario específico. Si bien es cierto que esta matriz no es adecuada para el estudio de numerosos contaminantes, resulta especialmente útil para el estudio de la exposición al mercurio (Hg) derivada del consumo de pescado (1), y un gran número de estudios con poblaciones diversas han empleado muestras de cabello con este propósito (2).

Por lo general, el cabello suele ser la opción preferente para valorar la exposición al metilmercurio, ya que se trata de una muestra fácil de obtener, integradora y no invasiva. De hecho, una vez que el mercurio se ha incorporado al cabello no puede volver al torrente sanguíneo, por lo que resulta un buen marcador a largo plazo de la exposición al metilmercurio. La mayor parte del mercurio presente en el cabello se encuentra en forma de metilmercurio, especialmente en aquellas poblaciones que consumen grandes cantidades de pescado. El metilmercurio se incorpora al cabello durante su formación, existiendo una relación relativamente directa entre las concentraciones de mercurio en cabello y sangre. En consecuencia, el análisis de mercurio en cabello ofrece un método preciso y fiable para determinar los niveles absorbidos (3).

El cabello es un material biológico que crece de manera cíclica, alternando entre períodos de crecimiento y períodos de quiescencia. En general se acepta que el cabello crece a un ritmo de 1 cm por mes, aunque esto puede variar en función del tipo de cabello y su ubicación en el cuerpo. Desde el punto de vista estructural, el cabello es una red polimérica reticulada, parcialmente cristalina y orientada, que contiene distintos grupos químicos funcionales capaces de fijar pequeñas moléculas. Está compuesto aproximadamente por proteínas en un 65% a 95%, de las que una proporción elevada presenta un elevado contenido en azufre. El agua representa aproximadamente entre el 15% y el 35% de su composición y los lípidos, entre el 1% y el 9%. El contenido mineral del cabello no llega al 1% (4,5).

El presente procedimiento operativo estándar ofrece instrucciones detalladas para la toma y análisis de muestras de cabello y la interpretación de los resultados. El control de calidad en la vigilancia biológica humana del mercurio se describe en un procedimiento independiente y debe tenerse en cuenta en cada una de las etapas.



1. Toma de muestras de cabello

La toma de muestras de cabello no requiere materiales técnicos sofisticados y los trabajadores de campo podrán tomar las muestras correctamente tras un simple entrenamiento. El procedimiento descrito permite tomar la muestra sin causar problemas estéticos, incluso en el caso de muestras de cabello corto, por lo que minimiza el riesgo de rechazo de los voluntarios por este motivo.

El procedimiento para la toma de muestras de cabello varía ligeramente en función de la longitud del mismo y de la movilidad del voluntario. El método descrito comprende las distintas posibilidades.

Es importante prestar especial atención a la cantidad de cabello muestreada (una muestra demasiado reducida puede comprometer el análisis) y a la inmovilización de los mechones.

La cantidad de muestra necesaria depende de la cantidad requerida para los análisis químicos, y esta variará en función del método analítico y el límite de cuantificación. Es preciso comprobar y definir estas cuestiones por adelantado con el laboratorio responsable del análisis.

La inmovilización del mechón constituye un paso crucial en la toma de muestras de cabello, ya que es necesario identificar de forma inequívoca el extremo más próximo al cuero cabelludo. El procedimiento operativo estándar describe varias posibilidades para llevar a cabo dicha inmovilización. Si se utiliza cinta adhesiva, debe tenerse especial cuidado con el segmento de la muestra que se va a analizar, ya que este debe estar libre de cinta adhesiva.

Este procedimiento operativo estándar propone puntos de control durante la recepción de la muestra para facilitar así la aplicación rutinaria del control para el rechazo o la aceptación de muestras.

Asimismo, se facilitan instrucciones detalladas sobre la preparación de las muestras de cabello para el análisis del mercurio.

1.1. Alcance del método

Este método puede utilizarse para obtener muestras de cabello de distinta longitud¹:

- inferior a 3,5 cm
- entre 3,5 y 5 cm
- superior a 5 cm

El método de preparación y alicuotado de las muestras también tiene en cuenta la longitud de las mismas y contempla dos situaciones, a saber: muestras inmovilizadas y muestras no inmovilizadas.

1.2. Medidas de seguridad

Durante la toma de muestras de cabello se deben tomar las siguientes precauciones:

- El trabajo con cabello no requiere medidas de seguridad especiales en relación a peligros biológicos.
- Se utilizarán guantes y tijeras adecuadas para la toma de muestras.

1.3. Material necesario

En la tabla 1 figuran los materiales necesarios para la toma de muestras de cabello, así como la justificación para su uso y las posibles alternativas.

¹ En función del segmento de muestra que se vaya a analizar, pueden definirse valores de corte diferentes.

Tabla 1. Material para la toma de muestras de cabello para el análisis de mercurio

Material	Justificación	Alternativa
Alcohol y algodón	Utilizado como medida de higiene.	
Guantes de látex (sin polvo)	Utilizados como medida de higiene.	Guantes desechables sin polvo o similares fabricados en otros materiales.
Tijera	Aunque se pueden utilizar diversos métodos para cortar la muestra, es recomendable emplear una tijera específica para cortar el cabello. Dado que el mechón debe cortarse muy cerca del cuero cabelludo, las tijeras de punta roma son útiles para evitar posibles cortes.	Cualquier tijera limpia y afilada de tamaño adecuado.
Etiquetas de identificación	Las muestras deben ser inequívocamente identificadas.	Escribir el código de identificación directamente en el sobre de papel con un rotulador de tinta indeleble.
Rotulador de tinta indeleble	Es necesario para indicar el extremo más próximo al cuero cabelludo. Los bolígrafos normales no escriben bien sobre la cinta adhesiva.	Cualquier otro material para escribir que garantice que la marca permanece claramente legible.
Cinta adhesiva	Se utiliza para fijar el mechón.	Cualquier otro material que garantice la inmovilización del mechón.
Bolsas de papel	Son el recipiente primario de las muestras. Los materiales de papel evitan los problemas derivados de la electricidad estática. Su tamaño irá en relación al tamaño de la muestra (p. ej., 8x14 cm; 12x20 cm).	Sobres de papel.
Bolsas de plástico con cierre hermético	Este segundo recipiente protege la muestra de los líquidos. Su tamaño irá en relación al tamaño de la muestra (p. ej., 8x14 cm; 12x20 cm).	Cualquier otro tipo de bolsa de plástico que asegure que la muestra se mantiene aislada.

Nota: El anexo 4 incluye una lista de verificación previa a la toma de muestras.

1.4. Preparación o tratamiento previo del material de toma de muestras

El material necesario para la toma de muestras de cabello no requiere una preparación o pretratamiento especial. No obstante, por cuestiones de higiene, se debe limpiar la tijera antes de tomar cada muestra. Todo el material debe estar preparado y a disposición del trabajador de campo que tomará la muestra.

A continuación se describe el procedimiento para la limpieza de la tijera.

1. Ponerse un par de guantes desechables.
2. Humedecer un trozo de algodón con alcohol.
3. Limpiar la tijera con el algodón húmedo (fotografía 1).



Fotografía 1. Limpieza de las tijeras. © Instituto de Salud Carlos III

1.5. Procedimiento para la toma de muestras

El procedimiento para la toma de muestras de cabello varía ligeramente en función de la longitud del cabello, ya que ésta determinará el modo de inmovilización del mechón. Adviértase que en este documento se presupone el análisis de los 3 cm más cercanos al cuero cabelludo. Si el análisis de muestras se lleva a cabo en un segmento de distinta longitud, es necesario asegurarse de que dicho segmento esté libre de cinta adhesiva.

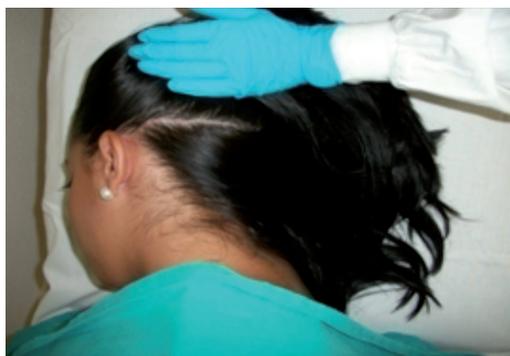
El material necesario para la toma de muestras de cabello debe estar preparado y al alcance de la persona o el equipo a cargo de la obtención de las muestras de cabello.

Las muestras deben ser tomadas en la misma zona de la cabeza en todos los voluntarios. En el caso del cabello largo, se obtendrán dos mechones, uno de cada lado de la cabeza. Para evitar los problemas estéticos, en el caso del cabello corto se deben cortar porciones de cabello pequeñas de distintos lugares, pero dentro de la misma zona de la cabeza².

1.5.1. Cabello de longitud superior a 5 cm

A continuación, se describe el procedimiento de toma de muestras de cabello con una longitud superior a 5 cm.

1. Tomar el cabello de la mitad de la parte posterior de la cabeza y sujetarlo en dirección hacia la coronilla (fotografías 2a y b).



Fotografías 2a y b. Tomar el cabello; a) voluntario sentado, b) voluntario recostado. © Instituto de Salud Carlos III

² En el sitio web del Centro Nacional de Sanidad Ambiental, Instituto de Salud Carlos III, hay disponible un vídeo sobre el procedimiento de toma de muestras de cabello (6).

2. Coger unos cuantos cabellos en dirección horizontal y enrollarlos para formar un mechón (fotografías 3a y b).



Fotografías 3a y b. Formar un mechón; a) voluntario sentado, b) voluntario recostado. © Instituto de Salud Carlos III

3. Inmovilizar el mechón con cinta adhesiva a 5-6 cm de la raíz del cabello (fotografías 4a y b). El análisis se lleva a cabo en los 3 cm más próximos al cuero cabelludo y, por tanto, hay que asegurarse de que este fragmento esté libre de cinta adhesiva.

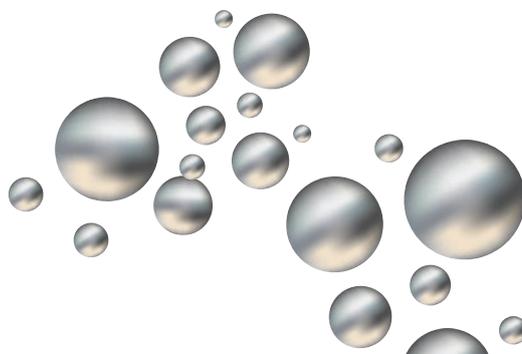


Fotografías 4a y b. Fijar el mechón con cinta adhesiva; a) voluntario sentado, b) voluntario recostado. © Instituto de Salud Carlos III

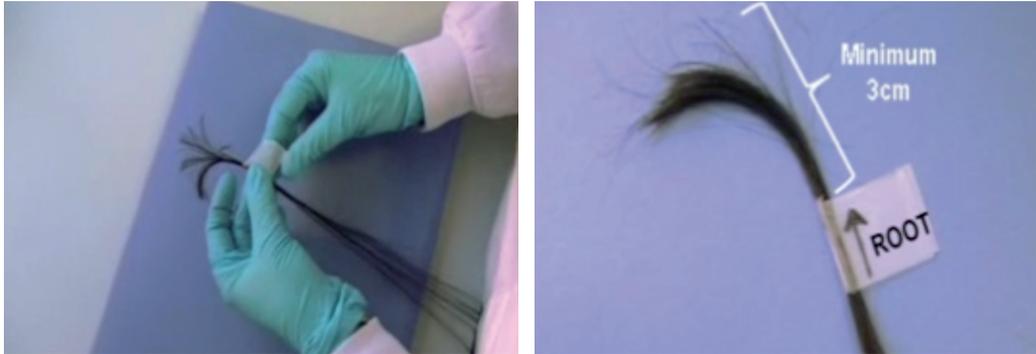
4. Utilizando la tijera, cortar la muestra lo más cerca posible del cuero cabelludo (fotografías 5a y b).



Fotografías 5a y b. Cortar la muestra cerca del cuero cabelludo; a) voluntario sentado, b) voluntario recostado. © Instituto de Salud Carlos III



- Sellar el extremo de la cinta adhesiva y marcar con una flecha que apunte en dirección al extremo más próximo a la raíz (fotografías 6a y b).



Fotografías 6a y b. Sellar la cinta adhesiva (a) y marcar con una flecha que apunte en dirección a la raíz (b). © Instituto de Salud Carlos III

Nota. La distancia mínima de la cinta adhesiva desde el extremo más próximo al cuero cabelludo depende del segmento de la muestra que se va a analizar (en este caso, los primeros 3 cm). Dicha porción debe estar libre de cinta adhesiva.

- Introducir la muestra de cabello en un sobre de papel y pegar la etiqueta con el código de identificación (ID) de la muestra (fotografía 7).



Fotografía 7. Introducir el cabello en un sobre de papel.
© Instituto de Salud Carlos III

- Repetir el proceso con un segundo mechón del otro lado de la parte posterior de la cabeza.
- Colocar el sobre de papel en una bolsa de plástico con cierre hermético (fotografía 8).



Fotografía 8. Colocar el sobre en una bolsa con cierre hermético.
© Instituto de Salud Carlos III

Nota. Para asegurar que se obtiene la cantidad de muestra necesaria, los mechones deben contener aproximadamente 250 cabellos. No obstante, el peso de la muestra puede variar dependiendo del tipo y la longitud del cabello. Se debe comprobar con el laboratorio que va a analizar la muestra cuál es la cantidad mínima requerida para el análisis.

1.5.2. Cabello de longitud inferior a 3,5 cm

Las muestras de cabello con una longitud inferior a 3,5 cm no se inmovilizarán con cinta adhesiva para asegurar así que el segmento de muestra no contiene cinta adhesiva.

A continuación, se describe el procedimiento para la toma de muestras de cabello de esta longitud.

1. Cortar entre 5 y 10 pequeños mechones de cabello de distintos lugares de la parte posterior de la cabeza (fotografías 9a y b).



Fotografías 9a y b. Cortar pequeños mechones de cabello; a) voluntario sentado, b) voluntario recostado. © Instituto de Salud Carlos III

2. Introducir la muestra de cabello directamente en un sobre de papel.
3. Repetir el proceso hasta obtener la cantidad de muestra deseada y etiquetar el sobre de papel con el código de ID de la muestra (fotografías 10a y b).



Fotografías 10a y b. Repetir el corte de pequeños mechones de cabello; a) voluntario sentado, b) voluntario recostado. © Instituto de Salud Carlos III

4. Colocar el sobre de papel en una bolsa de plástico con cierre hermético (fotografía 8).

Nota. Para asegurar que se obtiene la cantidad de muestra necesaria, el coordinador nacional de la encuesta o el laboratorio responsable deben facilitar un ejemplo o imagen de muestra de cabello para ayudar a los trabajadores de campo encargados de tomar las muestras (véase el ejemplo siguiente).

La siguiente cantidad es suficiente para el análisis directo de mercurio mediante espectrometría de absorción atómica con descomposición térmica y amalgamación (fotografía 11). Debe tenerse en cuenta que la cantidad mínima puede variar dependiendo de la técnica analítica y, en consecuencia, debe comprobarse con el laboratorio que va a analizar la muestra.



Fotografía 11. Cantidad suficiente de muestra de cabello. © Instituto de Salud Carlos III

1.5.3. Cabello de entre 3,5 y 5 cm

Para situaciones en las que la muestra de cabello presenta esta longitud, el modo de inmovilización del mechón viene determinado por la necesidad de evitar que la cinta adhesiva entre en contacto con los 3 cm más próximos al cuero cabelludo. Este requisito puede variar en función del segmento de muestra que se vaya a analizar.

A continuación, se describe el procedimiento para la toma de muestras de cabello de esta longitud.

1. Cortar un mechón de cabello lo más próximo posible al cuero cabelludo, de acuerdo con las instrucciones indicadas para muestras de cabello de más de 5 cm.
2. Al fijar el mechón, asegurarse de que los 3 cm más próximos al cuero cabelludo están disponibles para el análisis. Para ello existen diferentes alternativas y a continuación se describen tres ejemplos.

Primera opción

- a. Cortar un pedazo de cinta adhesiva.
- b. Colocar el extremo del mechón sobre la cinta adhesiva, con cuidado de dejar libres los 3 cm más próximos al cuero cabelludo (fotografía 12).

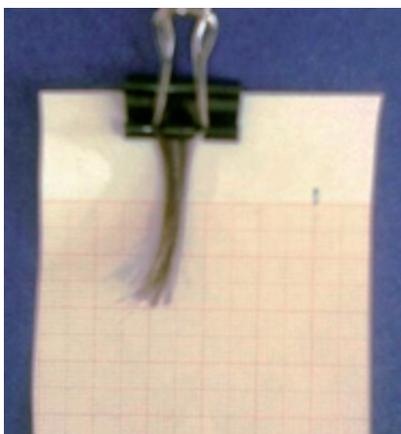


Fotografía 12. Colocar el mechón sobre la cinta.
© Instituto de Salud Carlos III

- c. Colocar otro pedazo de cinta adhesiva sobre el primero.
- d. Introducir la muestra de cabello en un sobre de papel y pegar la etiqueta con el código de ID.
- e. Repetir el proceso con un segundo mechón del otro lado de la parte posterior de la cabeza.
- f. Colocar el sobre de papel en una bolsa de plástico con cierre hermético.

Segunda opción

- a. Sujetar el extremo del mechón más próximo a la raíz con una pinza (sujetapapeles) y un trozo de papel (fotografía 13).



Fotografía 13. Sujetar el mechón con una pinza de papel.
© Instituto de Salud Carlos III

- b. Introducir la muestra de cabello en un sobre de papel y adherir la etiqueta con el código de ID.
- c. Repetir el proceso con un segundo mechón del otro lado de la parte posterior de la cabeza.
- d. Colocar el sobre de papel en una bolsa de plástico con cierre hermético.

Tercera opción

- a. Grapar la muestra de cabello lo más firmemente posible (fotografía 14).
- b. Comprobar que el mechón está completamente inmovilizado.



Photo 14. Stapling the hair sample.
© Instituto de Salud Carlos III

- c. Introducir la muestra de cabello en un sobre de papel y adherir la etiqueta con el código de ID.
- d. Repetir el proceso con un segundo mechón del otro lado de la parte posterior de la cabeza.
- e. Colocar el sobre de papel en una bolsa de plástico con cierre hermético.

1.6. Etiquetado

Inmediatamente después de obtener la muestra de cabello, esta debe ser etiquetada con el código de ID y la fecha del muestreo. De esta manera será más sencillo trazar la muestra en caso de que haya errores en uno de ellos. La etiqueta se debe adherir en el recipiente primario (el sobre de papel) y, si no se dispone de etiqueta, se puede escribir directamente el código sobre dicho recipiente.

1.7. Transporte y conservación de las muestras

Las muestras de cabello no requieren condiciones de transporte especiales; se pueden transportar a temperatura ambiente. No obstante, es imprescindible comprobar que las muestras van acompañadas de los documentos pertinentes, como por ejemplo el registro de las muestras recogidas o información sobre cualquier evento ocurrido durante el muestreo que haya podido afectar a las muestras (anexo 1).

1.8. Recepción de muestras

Los criterios para la aceptación o el rechazo de una muestra se deben definir por adelantado y deben aplicarse durante la recepción de las muestras. Dichos criterios deben centrarse en las condiciones de transporte, la documentación relacionada con las muestras, la integridad del embalaje, la identificación adecuada y la cantidad de muestra (suficiente para el análisis y almacenamiento en biobanco, si las muestras se van a almacenar y utilizar con otros fines de investigación).

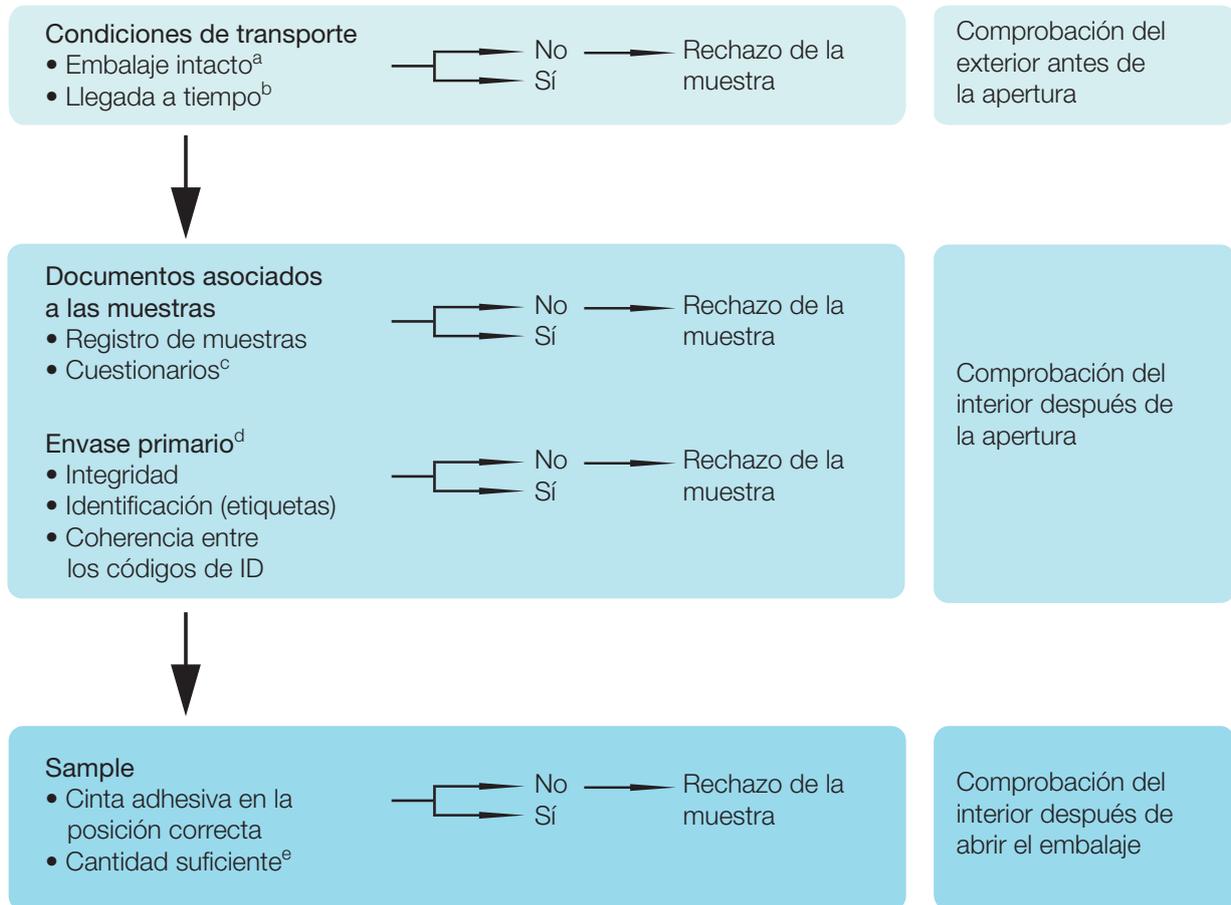
Al recibir las muestras de cabello, deben comprobarse los siguientes puntos.

- Integridad del embalaje: el embalaje debe estar cerrado correctamente y no presentar signos de manipulación; se puede colocar un sello de seguridad en el envase en el lugar donde se realice la toma de muestras.
- Documentos relacionados con las muestras: todas las muestras enumeradas en el registro de muestras tomadas (anexo 1) deben estar incluidas en el embalaje, y deben ir acompañadas de los correspondientes documentos (cuestionarios, etc.).
- Identificación correcta: las muestras y documentos recibidos deben estar identificados adecuadamente con el correspondiente código de ID (anexo 2).

- Cantidad y calidad de las muestras: las muestras deben haber sido tomadas de manera apropiada (comprobar la colocación de la cinta adhesiva y la cantidad de muestra de cabello toma).

Con el fin de seguir un procedimiento único y aplicar el mismo criterio para todas las muestras recibidas, se puede seguir el plan ilustrado en la figura 1.

Fig. 1. Plan para la recepción de muestras



^a El embalaje debe estar sellado correctamente y no deben observarse signos de manipulación.

^b Se debe definir por adelantado el plazo máximo entre el momento de obtención de la muestra y su llegada al laboratorio.

^c Si una o más preguntas de los cuestionarios son cruciales para la interpretación de los resultados o representan un criterio de inclusión o exclusión, estas deberán verificarse.

^d Se debe comprobar el estado de la bolsa de plástico con cierre hermético. Todas las muestras deben estar adecuadamente identificadas y se comprobará la congruencia entre los códigos de ID de las muestras y de los cuestionarios.

^e La cantidad de muestra es un aspecto crucial. Si la cantidad de la muestra es insuficiente para llevar a cabo el análisis químico, se rechazará.

El anexo 3 incluye un ejemplo de registro de recepción de muestras y en los anexos 4 y 5, figuran las listas de verificación previa y posterior al muestreo.

1.9. Preparación de alícuotas de las muestras

Todas las muestras aceptadas deben prepararse para el análisis y conservación en recipientes de polipropileno cerrados herméticamente, para evitar así el deterioro de la matriz y el analito específico. En la tabla 2 se enumeran los materiales que se utilizarán durante esta fase.

En el laboratorio las muestras se identificarán mediante códigos numéricos con el objeto de proteger la confidencialidad de los voluntarios. Las muestras deben estar inequívocamente identificadas para poder cruzar los resultados de laboratorio con la información demográfica, dietética o de estilos de vida recopilada en el estudio.

Tabla 2. Material para la preparación de alícuotas de las muestras de cabello

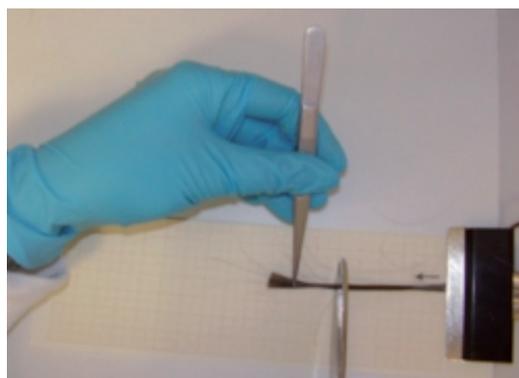
Material	Justificación	Alternativa
Etanol al 70%	Para la limpieza de las pinzas y la tijera entre el procesamiento de diferentes muestras.	
Guantes de látex (sin polvo)	Utilizados como medida de higiene.	Guantes desechables sin polvo o similares fabricados en otros materiales.
Papel milimetrado	El segmento de muestra para el análisis debe ser cortar del resto del mechón.	Regla.
Pinzas de laboratorio	Para la manipulación de las muestras.	Cualquier otro elemento que permita la correcta manipulación de las muestras.
Tijera	El segmento de muestra de cabello que se va a analizar debe cortarse en secciones pequeñas.	Cualquier tijera limpia y afilada de tamaño adecuado.
Pinza de papel	Se utiliza para fijar el mechón.	Cualquier otro objeto que permita fijar el mechón correctamente.
Recipiente de polipropileno	Para el almacenamiento de las muestras de cabello.	Cualquier otro recipiente que permita mantener la muestra libre de humedad.
Etiquetas	Las muestras se deben identificar inequívocamente.	Escribir el código de ID con rotulador de tinta indeleble.

ID = identificación.

1.9.1. Muestras de cabello largo inmovilizadas

A continuación, se describe el procedimiento de preparación de muestras de cabello inmovilizadas (es decir, muestras de una longitud superior a 5 cm y aquellas que midan entre 3,5 y 5 cm).

1. Extraer con ayuda de las pinzas el mechón de cabello de la bolsa en la que se proporciona la muestra.
2. Colocar el mechón en una hoja de papel milimetrado que cubra la superficie de trabajo y fijarlo con la pinza de papel por el extremo opuesto al más próximo al cuero cabelludo (fotografía 15). El papel milimetrado debe cambiarse entre muestra y muestra.



Fotografía 15. Fijación del mechón con una pinza. © Instituto de Salud Carlos III

3. Cortar los primeros 3 cm (o la longitud definida para el análisis) más próximos al cuero cabelludo con la ayuda de unas pinzas de laboratorio.
4. Colocar el segmento en el recipiente etiquetado con el código de identificación de la muestra. La tapa debe estar etiquetada con el mismo código. El cabello restante se eliminará de igual forma que los residuos convencionales.
5. Cortar la muestra en trozos lo más pequeños posible con ayuda de la tijera (fotografía 16).



Fotografía 16. Trocear la muestra en trozos pequeños.
© Instituto de Salud Carlos III

6. Asegurar la homogeneidad de la muestra final (fotografías 17a y b).



Fotografías 17a y b. Garantizar una muestra homogénea. © Instituto de Salud Carlos III

7. Seguir el mismo proceso con el resto de las muestras.
8. Entre muestra y muestra, limpiar las pinzas y la tijera con una solución de etanol al 70%.
9. Para preparar las alícuotas de cabello, pesar la cantidad requerida por el laboratorio en un recipiente de polipropileno y colocar la etiqueta con el código de ID de la muestra.

1.9.2. Muestras de cabello corto no inmovilizadas

A continuación, se describe el procedimiento para la preparación de muestras de cabello que no se han sido inmovilizadas con cinta adhesiva (es decir, aquellas muestras con una longitud inferior a 3,5 cm).

1. Colocar la muestra de cabello directamente en el recipiente sirviéndose de las pinzas. El recipiente y su tapa deben estar etiquetados con el mismo código identificativo.
2. Cortar la muestra con la tijera en trozos lo más pequeños posible.
3. Garantizar la homogeneidad de la muestra final.
4. Entre muestra y muestra, limpiar las pinzas y la tijera con una solución de etanol al 70%.
5. Para preparar las alícuotas de cabello, pesar la cantidad requerida por el laboratorio en un recipiente de polipropileno y colocar la etiqueta con el código de ID de la muestra.

1.10. Almacenamiento y conservación

Las muestras de cabello no requieren condiciones de almacenamiento especiales. Pueden almacenarse a temperatura ambiente, pero preservándolas de la humedad, por ejemplo, en un cajón o una caja.

Para garantizar la trazabilidad de las muestras y alícuotas, se debe elaborar una base de datos que incluya el código de ID de las muestras, el código de ID de la alícuota, si es necesario (p. ej., el código interno conforme a un sistema de control de calidad interno), la fecha de toma de la muestra, la fecha de la preparación de la alícuota y la cantidad aproximada restante tras el análisis.

1.11. Control de calidad

1.11.1. Documentos asociados a la muestra

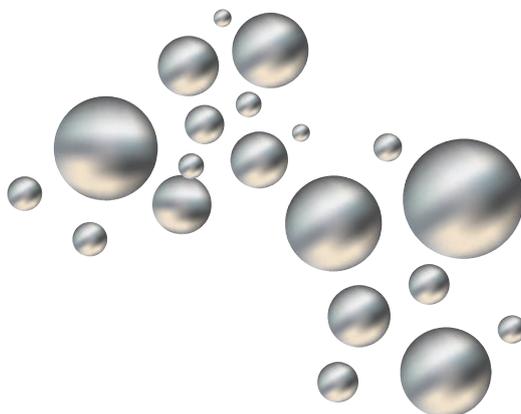
La trazabilidad de las muestras a lo largo del estudio es un aspecto crucial y por ello, deben tomarse las medidas necesarias para garantizarla. Como se ha mencionado anteriormente, es fundamental etiquetar correctamente las muestras y los documentos relacionados, pero también es necesario poder vincular las muestras con la información facilitada por los voluntarios. Para ello, todos los documentos relacionados con las muestras (cuestionarios, registros, etc.) deben etiquetarse inmediatamente con el mismo código de ID que la muestra.

1.11.2. Listas de verificación

Los trabajadores de campo deben controlar cada paso del procedimiento de muestreo con el propósito de garantizar la calidad de las muestras. A tal efecto, las listas de verificación son una herramienta útil que los equipos de campo deben desarrollar de acuerdo con las características de cada situación.

Se deben considerar los siguientes puntos de control.

- Antes de la toma de muestras: comprobar que todo el material necesario para tomar las muestras está preparado, así como todos los documentos relacionados (véase en el anexo 4 un ejemplo de lista de verificación previa al muestreo).
- Después de la toma de muestras: comprobar que todas las muestras en el embalaje de transporte van acompañadas de los documentos correspondientes. Este control debe incluir la verificación de la correlación entre los códigos de identificación de los documentos y muestras. Los trabajadores de campo deben verificar que los cuestionarios y registros han sido correctamente cumplimentados (véase en el anexo 5 un ejemplo de lista de verificación posterior al muestreo).



2. Análisis de la concentración de mercurio total presente en el cabello

Existen numerosos métodos analíticos para la determinación de la concentración de mercurio total en cabello. Entre ellos, los más utilizados son la espectrometría de absorción atómica de vapor frío (CVAAS) y la espectrometría de fluorescencia atómica de vapor frío (CVAFS). Algunos métodos, como el análisis por activación por neutrones o la fluorescencia de rayos X, permiten el análisis secuencial del cabello. También se utilizan la espectrometría de emisión óptica por plasma acoplado inductivamente (ICPOES), la espectrometría de emisión atómica por plasma acoplado inductivamente (ICPAES), la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICPMS), la espectrometría de absorción atómica con horno de grafito (GFAAS) y la emisión de rayos X inducida por partículas (PIXE). La mayoría de estos métodos requieren la digestión previa de las muestras, lo que aumenta la posibilidad de contaminación o pérdida. Por el contrario, las técnicas de introducción directa de sólidos, que no requieren el tratamiento previo de las muestras, generan muy pocos residuos químicos y reducen el riesgo de contaminación de la muestra. Además, permiten emplear menor cantidad de muestra en el análisis, lo que mejora el rendimiento de los ensayos. Estas ventajas hacen del análisis directo del mercurio por espectrometría de absorción atómica un método muy útil para el análisis del cabello en los estudios de vigilancia biológica humana (7). Esta técnica combina la combustión, la amalgamación con oro del mercurio y la detección mediante espectrometría de absorción atómica, y requiere una preparación mínima de las muestras (8).

El lavado de las muestras de cabello es un tema controvertido que se ha discutido como consecuencia de la posibilidad de deposición atmosférica de mercurio. El procedimiento de lavado idóneo debe eliminar únicamente el mercurio externo y mantener intacto el mercurio endógeno. La inclusión de un paso de lavado en el análisis del cabello implica una manipulación adicional de la muestra y, por tanto, la posibilidad de que tenga lugar la pérdida de mercurio o la contaminación de la muestra.

Se han probado distintos métodos de lavado con diferentes solventes y se ha comprobado que algunos pueden eliminar el mercurio endógeno (9-11). La conveniencia de lavar las muestras debe valorarse en estudios realizados en determinadas zonas en las que la principal fuente de exposición al mercurio no es el consumo de pescado, como por ejemplo las poblaciones expuestas a la minería artesanal del oro o que residen en áreas cercanas a determinadas industrias (p. ej., plantas de generación de energía mediante el carbón, industrias cloro - álcali, etc.) o vertederos de residuos de mercurio (12). Asimismo, el cuestionario del estudio debe incluir preguntas específicas para evaluar esta potencial exposición.

El método descrito en el presente procedimiento operativo estándar permite determinar de manera exacta y fiable la concentración de mercurio total en muestras de cabello, en los intervalos de concentración típicos asociados a la exposición ambiental y ocupacional.

Dado que este método no requiere la extracción ni el tratamiento previo de las muestras, es de esperar una cantidad escasa de residuos químicos y un mínimo riesgo de contaminación. La cantidad reducida de muestra utilizada y la brevedad de los tiempos de análisis permiten procesar un elevado número de muestras en poco tiempo.

Aunque en este procedimiento se recomienda una cantidad de muestra de entre 3,0 y 6,0 mg, el laboratorio puede establecer su propio valor teniendo en cuenta el equipo utilizado, el desarrollo y la validación del método, así como los valores previstos para sus muestras.

Se debe prestar especial atención a la cantidad de cabello recibida en el laboratorio para el análisis, ya que una cantidad demasiado escasa puede comprometer el resultado del análisis y por ello, es aconsejable solicitar una cantidad mínima de muestra de 300 mg.

Para evitar problemas de cuantificación en poblaciones con una exposición baja a mercurio, es recomendable que el método analítico empleado tenga un límite de cuantificación al menos de 0,01 nanogramo de mercurio por miligramo de cabello.

Se ha establecido un límite de cuantificación de concentraciones de mercurio de 1 ng para la configuración de dos celdas de medida descrita en este documento. Dado que el peso máximo de

la muestra para la configuración del equipo descrita en este procedimiento operativo estándar es 100 mg, se podría alcanzar un límite de cuantificación de 0,01 ng/mg. Podrían alcanzarse límites de detección inferiores, si fuera necesario, utilizando instrumentos con una tercera celda de medida.

Se debe prestar especial atención a las tasas de recuperación para los niveles más bajos, ya que los valores aceptables se encuentran siempre por encima del 80%.

El nivel más alto para la curva de calibrado en este método es de 25 ng de mercurio, aunque el laboratorio puede modificar los puntos de calibrado durante el proceso de validación.

A pesar de que el analizador de mercurio puede alcanzar concentraciones de mercurio de hasta 1.000 ng, estos niveles no son necesarios para determinar el mercurio presente en las muestras de cabello, por lo que no se han considerado en el presente documento.

La linealidad, precisión, exactitud e incertidumbre han sido determinadas para cada uno de los niveles de la curva de calibración. Cada laboratorio debe establecer sus propios niveles para la validación del método, aunque se debe incluir al menos una concentración próxima al límite de cuantificación.

En aquellos casos en los que el laboratorio disponga de un equipo alternativo para la detección del mercurio en muestras digeridas en ácido, se recomienda seguir las instrucciones facilitadas por el fabricante del instrumento. Las instrucciones para el muestreo y la manipulación de muestras incluidas en el presente procedimiento operativo estándar son aplicables independientemente del instrumental empleado para el análisis de mercurio. Se debe comprobar que tanto el límite de detección como el límite de cuantificación son adecuados para la determinación de las muestras de cabello.

2.1. Alcance del método

El método descrito en este procedimiento operativo estándar permite la cuantificación rápida y precisa del mercurio presente en muestras de cabello humano. El rango del ensayo es de 1-25 ng de mercurio total.

2.2. Fundamento teórico

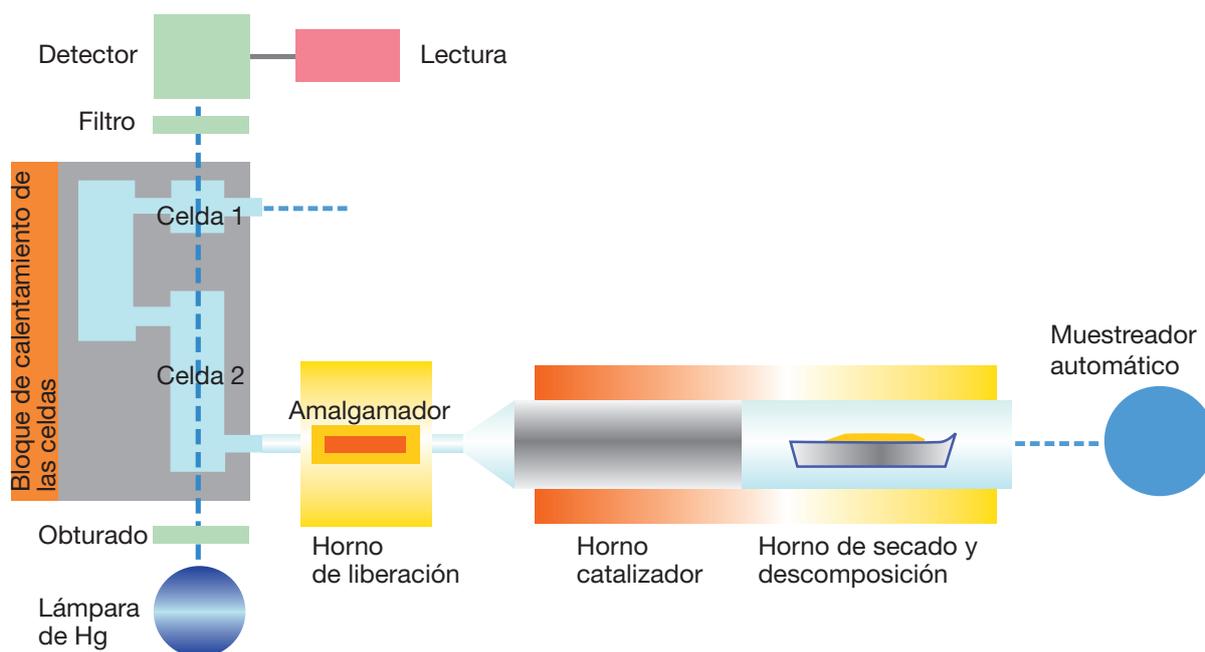
En el presente procedimiento operativo estándar, se determina el mercurio presente en el cabello mediante espectroscopia de absorción atómica con descomposición térmica y amalgamación con oro, una técnica analítica muy sensible y selectiva, especialmente adecuada para el análisis de trazas. Esta técnica se utiliza habitualmente en los estudios de vigilancia biológica de la exposición a largo plazo con el objeto de detectar concentraciones de mercurio muy bajas en muestras humanas no invasivas.

Las muestras de cabello se pesan e introducen en la navecilla sin ningún tratamiento previo. A continuación, se introduce la muestra en el analizador directo de mercurio (fig. 2), donde primero se seca y después se descompone térmicamente en presencia de un flujo continuo de oxígeno. Los productos de la descomposición son transportados mediante el flujo de oxígeno hasta la sección catalítica del horno. Los vapores de mercurio se retienen en un amalgamador de oro y son liberados posteriormente para su cuantificación. El contenido de mercurio se determina mediante espectrofotometría de absorción atómica a 254 nm.

La determinación cuantitativa del contenido de mercurio se efectúa mediante una curva de calibración obtenida a partir de los materiales de referencia del cabello analizados del mismo modo que las muestras de cabello.

El analizador directo del mercurio se puede configurar de diversas maneras dependiendo del tipo y el modelo empleado. Para el procedimiento aquí descrito, se utilizó una versión estándar equipada con dos celdas de medida de distinto paso. Los valores de referencia para los rangos de trabajo de las dos celdas de medida son de concentraciones de mercurio de entre 0 - 20 ng (rango bajo) y 20 - 1.000 ng (rango alto).

Fig. 2. Analizador directo de mercurio



Hg = mercurio.

Nota: la versión estándar de Milestone DMA-80 (en la ilustración) está equipada con dos celdas de medida, una lámpara de mercurio y un detector de mercurio.

Fuente: Milestone (13).

2.3. Medidas de seguridad

Al analizar la concentración de mercurio total presente en el cabello se deben tomar las siguientes precauciones.

- La manipulación de muestras de cabello no requiere medidas de seguridad especiales para peligros biológicos.
- Al manipular las soluciones, se deben utilizar guantes, bata de laboratorio y gafas de seguridad.
- Prestar especial atención al manipular el ácido clorhídrico concentrado, ya que es un producto químico cáustico que puede causar lesiones graves en la piel y los ojos.
- Entre los posibles riesgos asociados con la utilización del equipo figuran la exposición a radiación ultravioleta, el voltaje de alta tensión y las temperaturas elevadas.

2.4. Equipo, materiales y soluciones

2.4.1. Equipo

Para analizar la concentración de mercurio total presente en el cabello se requiere el siguiente equipo:

- un analizador directo de mercurio (p. ej., Milestone DMA-80).

2.4.2. Materiales

Para analizar la concentración de mercurio total presente en el cabello se requiere el siguiente material:

- una balanza analítica (precisión: 0,01 mg);
- una micropipeta, ajustable entre 100 y 1.000 μL ;

- tijera;
- espátula;
- navecillas de níquel, 0,5 ml;
- navecillas de cuarzo de 1,5 ml;
- pinzas antiestáticas;
- un transportador de platillos de muestra;
- matraz aforado de 100 ml;
- guantes sin talco.

2.4.3. Reactivos, sustancias químicas y gases

Para analizar la concentración de mercurio total presente en el cabello se requieren los siguientes reactivos, sustancias químicas y gases:

- oxígeno gas (pureza del 99,995%);
- etanol al 70% (pro-análisis);
- ácido clorhídrico al 37% (pro-análisis);
- agua purificada (agua bidestilada).

2.4.4. Soluciones

Para analizar la concentración de mercurio total presente en el cabello se requiere la siguiente solución:

- ácido clorhídrico al 37% (pipetear 1 ml de ácido clorhídrico al 37% en un matraz aforado de 100 ml, llenar hasta el volumen nominal con agua ultrapura).

2.4.5. Patrones de calibración

Se utilizan dos materiales de referencia de cabello con distintos niveles de mercurio. En el presente procedimiento operativo estándar se emplean los siguientes patrones:

- NIES CRM N.º 13 (NIES-13): $4,42 \pm 0,20$ ng/mg
- Material de referencia IAEA-086: 0,573 (0,534-0,612) ng/mg.

2.5. Calibración

La calibración se lleva a cabo empleando materiales de referencia de cabello NIES-13 y IAEA-086 en el rango de concentraciones de 1 - 25 ng de mercurio.

La tabla 3 incluye el peso aproximado del material de referencia que se ha de pesar por triplicado en cada punto de calibrado.

A continuación, se miden los patrones de calibrado bajo las mismas condiciones que las muestras. Los parámetros de ecuación cuadrática y el coeficiente de correlación r^2 se obtienen a partir de la curva de calibración resultante. Estos parámetros deben ajustarse a los rangos establecidos en la validación del método.

La frecuencia de calibración será definida por el laboratorio. A modo de referencia, se debe realizar una calibración nueva cada tres meses. También será necesario realizar una calibración nueva si los valores de las muestras de control de calidad no caen dentro del rango establecido.

Tabla 3. Peso de los materiales de referencia

Hg (ng)	Material de referencia	Peso (mg)
0		0,00
1	IAEA 086	1,75
2,5	IAEA 086	4,36
5	IAEA 086	8,73
10	NIES 13	2,26
15	NIES 13	3,39
20	NIES 13	4,53
25	NIES 13	5,66

Hg = mercurio, IAEA = Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA), NIES = Instituto Nacional de Estudios Ambientales.

2.6 Procedimiento

2.6.1. Acondicionamiento del equipo analítico

Datos técnicos

A continuación, se especifican los datos técnicos del equipo analítico:

- principio: espectrometría de absorción atómica;
- sistema de detección de mercurio: espectrofotómetro de haz simple con flujo secuencial a través de dos celdas de medida;
- fuente de luz: lámpara de vapor de mercurio de baja presión;
- longitud de onda: 253,65 nm;
- filtro de interferencia: 254 nm, ancho de banda de 9 nm;
- detector: fotodetector ultravioleta de silicio
- muestreador automático: integrado, 40 posiciones;
- gas portador: oxígeno, con entrada de presión 4 bares (60 psi), caudal aproximado de 200 ml/min.

Los datos técnicos que se indican aquí se establecieron durante la configuración del instrumento utilizado en este caso.

Paso 1. Preparación del analizador directo de mercurio

Se deben llevar a cabo las siguientes operaciones de acuerdo al manual del usuario: apertura del suministro de oxígeno, inicio del analizador directo de mercurio y creación de un archivo de datos.

Paso 2. Limpieza del sistema

Se debe medir una posición vacía siguiendo el método apropiado. Las condiciones de medida que se detallan a continuación se establecieron para la configuración del instrumento utilizado en este caso y deben optimizarse para otros instrumentos según las indicaciones del fabricante:

- tiempo de secado: 10 s;
- temperatura de secado: 200 °C;
- tiempo de descomposición: 240 s;
- temperatura de descomposición: 650 °C;
- tiempo de purga: 60 s.

Este paso se repite hasta obtener de forma consecutiva dos valores de la absorbancia inferiores a 0,003. Si no se obtiene el nivel de fondo deseado, se debe limpiar el analizador directo de mercurio mediante el análisis de una solución de ácido clorhídrico (0,37%) en una navecilla de cuarzo. Acto seguido, se repetirá el paso de limpieza del sistema.

Paso 3. Comprobación del nivel de fondo del sistema

Deben medirse tres navecillas de combustión de níquel vacías, aplicando el método anterior. Los valores de estas lecturas deben ser inferiores a 0,003, de lo contrario habrá que limpiar las navecillas.

Paso 4. Control de calidad previo a la medida

Se deben analizar dos muestras de material de referencia certificado IAEA-086 con concentraciones de mercurio de 5 ng aproximadamente (alrededor de 8,7 mg de material) con los siguientes parámetros (parámetros orientativos que deben optimizarse para otros instrumentos de acuerdo con las instrucciones del fabricante):

- temperatura de secado: 200 °C;
- tiempo de secado: 60 s;
- temperatura de descomposición: 650 °C;
- tiempo de descomposición: 150 s;
- tiempo de purga: 60 s.

El valor de la concentración determinada para la muestra del segundo material de referencia debe encontrarse en el rango de incertidumbre correspondiente a este punto definido durante la validación. En caso contrario, se repetirá la medida hasta obtener un valor dentro del rango. Si tras cinco intentos no se obtiene dicho valor, será necesario recalibrar el sistema.

Una vez concluidos satisfactoriamente los cuatro pasos anteriores, el analizador directo de mercurio estará listo para el análisis de las muestras.

2.6.2. Determinación analítica

Pesaje de muestras

Tanto las navecillas de combustión como el soporte utilizado para pesar las muestras de cabello deben ser manipulados con pinzas.

Colocar el soporte de la navecilla de combustión en la balanza. Colocar una navecilla de combustión de níquel sobre el soporte y poner a cero la balanza.

Abrir el recipiente que contenga la muestra y transferir porciones pequeñas de cabello a la navecilla con ayuda de una espátula, hasta alcanzar un peso de entre 3,0 y 6,0 mg.

Colocar la navecilla con la muestra en la bandeja de muestra y anotar el código de la muestra, el

peso y la posición del platillo en el registro de pesaje. Se prepararán tres réplicas para cada una de las muestras.

La espátula debe limpiarse entre muestra y muestra con una solución de etanol al 70%.

Para asegurar que el analizador está midiendo correctamente, cada tres muestras (nueve navecillas de combustión), se pesará una muestra de control de calidad consistente en una cantidad de material de referencia que variará de manera aleatoria entre los puntos incluidos en la curva de calibración.

Análisis de muestras

Las navecillas de combustión de níquel con las muestras y los controles de calidad deben colocarse en el muestreador automático del analizador directo de mercurio en el orden en que se pesaron.

A continuación, se programará el análisis de las muestras y los controles de calidad introduciendo su código y peso, y seleccionando el método y la última calibración válida. Los parámetros del método son los siguientes (los parámetros son orientativos y deben optimizarse para otros instrumentos de acuerdo a las instrucciones del fabricante):

- temperatura de secado: 200 °C;
- tiempo de secado: 60 s;
- temperatura de descomposición: 650 °C;
- tiempo de descomposición: 150 s;
- tiempo de purga: 60 s.

Bajo estas condiciones, el tiempo de análisis para cada muestra es de alrededor de cinco minutos.

2.6.3. Cálculo de los resultados analíticos

El equipo expresa los datos directamente en nanogramos de mercurio por miligramo de cabello (ng Hg/mg) mediante la interpolación de la medida en la curva de calibración.

El valor final indicado corresponde a la media de las tres réplicas por muestra. La desviación típica de estas medidas se puede calcular con la siguiente fórmula.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (c_i - \bar{c})^2}{n - 1}}$$

SD: desviación típica

c_i : valor de la muestra individual

\bar{c} : media

n: número de medidas

La incertidumbre de medida se puede calcular mediante la fórmula obtenida en el procedimiento de validación.

2.6.4. Rango de resultados válidos

Los valores de mercurio son válidos en el rango entre el límite de cuantificación (1 ng de mercurio) y el patrón de calibración más alto (25 ng de mercurio).

Si la cantidad de mercurio de la muestra se encuentra fuera de este rango, se volverá a analizar la muestra de la siguiente manera:

- Si el valor es inferior a 1 ng (la concentración de mercurio más baja incluida en la calibración), a partir de la concentración obtenida, debe pesarse la cantidad de cabello necesaria para tres nuevas réplicas para intentar obtener una nueva determinación dentro del rango de calibración.

Teniendo en cuenta el contenido orgánico de la muestra y la capacidad de las navetas de níquel utilizadas, la cantidad máxima de muestra que se puede introducir en el analizador directo de mercurio DMA-80 es de 100 mg.

- Si el valor es superior a 25 ng (el patrón más alto de mercurio incluido en la calibración), a partir de la concentración obtenida, debe pesarse la cantidad de cabello necesaria para tres nuevas réplicas para intentar obtener una nueva determinación dentro del rango de calibración. El peso de la muestra no debe ser inferior a 1 mg.

Solo se considerarán válidas las medidas obtenidas entre dos controles de calidad cuyos valores estén incluidos en el rango definido como aceptable (valor asignado al material de referencia \pm la incertidumbre en dicho nivel). Será necesario realizar una calibración nueva si los valores de las muestras de control de calidad no se encuentran dentro del rango establecido.

Si la concentración de una de las réplicas no se encuentra dentro del rango determinado por la media \pm la incertidumbre, se debe aplicar la prueba Q para determinar si es preciso descartar el valor sospechoso.

$$Q = \frac{X_{\text{sospechoso}} - X_{\text{más próximo}}}{X_{\text{más alto}} - X_{\text{más bajo}}}$$

Q: valor Q correspondiente a la evaluación de acuerdo con la prueba Q

X: valor único (valor sospechoso, valor más próximo al valor sospechoso, valor más alto y valor más bajo)

Si Q es superior o igual a 0,970, se puede rechazar el valor sospechoso y calcular la concentración de la muestra como la media de los dos valores restantes. Si es inferior, la muestra debe volver a analizarse.

2.7 Control de calidad

La precisión y exactitud de los análisis de biomarcadores efectuados por los laboratorios de toxicología deben comprobarse continuamente mediante medidas de aseguramiento de la calidad.

En general, las medidas de aseguramiento de la calidad aplicadas por los laboratorios comprenden controles de calidad internos y externos (véase también la sección *Programa de control de calidad para la vigilancia biológica humana del mercurio*).

2.7.1. Control de calidad interno

El aseguramiento de la calidad interno conlleva la supervisión sistemática de la repetibilidad, la comprobación de los errores aleatorios, y la evaluación de la exactitud de las determinaciones cuantitativas del laboratorio.

En la práctica, la repetibilidad se comprueba mediante un material de control (material de referencia), que se incluye en cada serie analítica. Los resultados de los controles de calidad internos diarios o por lotes se introducen en gráficos de control.

Si existe en el mercado material de referencia, el material de control se puede preparar mediante el enriquecimiento de una muestra nativa (sangre, orina, etc.) con una cantidad conocida del analito de interés (biomarcador). Las alícuotas de esta muestra se pueden utilizar como control de calidad interno, así como en los programas de comparación entre laboratorios. Debe comprobarse que este material es y se mantiene homogéneo en condiciones de almacenamiento y transporte específicas y que, además, la concentración de analito permanece inalterable. El material de control debe abarcar todo el rango de concentraciones (por ejemplo, Q_{baja}, Q_{media}, Q_{alta}) e incluir también blancos.

La exactitud debe comprobarse, preferiblemente, con material de referencia certificado (CRM), es decir, material (biológico) con una concentración certificada de uno o más analitos. La certificación se lleva a cabo como parte de un programa en el que los laboratorios expertos en el análisis del biomarcador en cuestión analizan los materiales de control.

Tras un procedimiento de validación que comprende procedimientos estadísticos, además del juicio de expertos, se define un valor certificado para cada analito presente en la muestra. Esto hace que los materiales de referencia certificados sean costosos y por ello, solo deben utilizarse al validar o revalidar un método analítico.

En el presente procedimiento operativo estándar, se utilizan materiales de control de calidad para evaluar la exactitud y precisión del método de análisis y determinar si el sistema analítico obtiene resultados de exactitud y precisión aceptables.

Para evaluar el método se han utilizado dos materiales de referencia de cabello con niveles de mercurio distintos, a saber, el material de referencia certificado NIES CRM N.º 13 (4,42 ng/mg) y el material de referencia IAEA-086 (0,573 ng/mg).

Cada tres muestras (nueve medidas), se incluyen controles de calidad consistentes en una cantidad del material de referencia que varía aleatoriamente entre los puntos incluidos en la curva de calibración.

Solo se consideran válidas las medidas obtenidas entre dos controles de calidad cuyos valores estén incluidos en el rango definido como aceptable (valor asignado al material de referencia \pm la incertidumbre en dicho nivel).

Como parte del programa de control de calidad interno, se miden dos muestras ciegas de cabello al año.

2.7.2. Control de calidad externo

El control de calidad externo permite mejorar la comparabilidad y la exactitud de los resultados analíticos. La comparabilidad es el estado previo de la exactitud y garantiza que es posible comparar los resultados analíticos entre laboratorios y con los valores límite correspondientes.

Para poder aplicar medidas sanitarias preventivas independientemente del laboratorio en el que se analice la muestra biológica, es necesario que los resultados de los estudios de vigilancia biológica humana sean exactos y comparables.

Los estudios de comparabilidad entre laboratorios permiten armonizar los métodos analíticos y su aplicación, por lo que mejoran la comparabilidad de los resultados analíticos. A tal fin, se pueden utilizar materiales de control (materiales de referencia). Los estudios de comparabilidad entre laboratorios son necesarios incluso cuando los laboratorios utilizan el mismo procedimiento operativo estándar para realizar los análisis.

Los sistemas de evaluación externa de la calidad permiten mejorar la exactitud de los resultados analíticos. Para ello, normalmente se analiza un material de control en laboratorios de referencia que han demostrado un nivel alto de competencia en el análisis de un biomarcador específico. A partir de los resultados obtenidos por los laboratorios de referencia se determinan los valores asignados y los intervalos de tolerancia correspondientes a los biomarcadores analizados. Los laboratorios que participan en un sistema de evaluación externa de la calidad obtienen la certificación de los resultados incluidos en el rango de tolerancia.

El control de calidad externo consiste en la participación en pruebas denominadas “round-robin” (tres veces al año). A modo de ejemplo, se recomienda la participación regular en el Sistema de Evaluación Externa de la Calidad Multielemento de Quebec (QMEQAS), organizado por el Centre de Toxicologie du Québec del Institut National de Santé Publique (Canadá).

2.8. Evaluación del método

2.8.1. Función de respuesta

La relación entre la respuesta de un instrumento analítico y la concentración o cantidad de un analito introducida en el instrumento se denomina “curva de calibración”.

A efectos del presente procedimiento operativo estándar, se ha comprobado la respuesta del método para el rango de concentraciones de 0 - 25 ng de mercurio y se ha establecido un modelo de regresión cuadrática para la curva de calibración.

Los datos obtenidos se analizan estadísticamente para calcular la curva de regresión y el coeficiente de regresión.

Se debe obtener una curva con un coeficiente de regresión superior a 0,997.

2.8.2. Precisión

Es una medida del grado de dispersión de los resultados analíticos debido a errores aleatorios.

La precisión se describe estadísticamente por medio de la desviación típica o el intervalo de confianza. Se puede distinguir entre los siguientes tipos:

- precisión en condiciones repetidas (repetibilidad);
- precisión en condiciones comparables (reproducibilidad).

Es necesario definir los materiales que se van a utilizar para llevar a cabo estas determinaciones, así como los métodos de cálculo.

Los distintos niveles de mercurio incluidos en la calibración (véase la sección 2.5) se midieron por triplicado en 16 días diferentes, por dos analistas distintos, con el fin de determinar la precisión para cada nivel. Las tablas 4 a 6 recogen estos datos.

Tabla 4. Máxima desviación típica permitida

Concentración (ng Hg)	RSDrepro	RSDrepet
1	4,9	6,4
2,5	4,1	4,9
5	3,4	3,6
10	1,2	2,3
15	0,8	1,4
20	0,5	0,9
25	0,3	1,1

Hg = mercurio; ng = nanogramo; RSDrepet = desviación típica relativa para la repetibilidad; RSDrepro = desviación típica relativa para la reproducibilidad.

2.8.3. Exactitud

Es una medida de la desviación del valor medido con respecto al valor correcto (“verdadero”) a causa de un sesgo. Para comprobar la exactitud de un método existen diferentes alternativas:

- desempeño de las pruebas de recuperación (procedimientos de enriquecimiento);
- participación en estudios de comparabilidad entre laboratorios en los que los laboratorios de referencia autorizados definen el valor teórico;
- comparación del procedimiento analítico que se va a validar con un procedimiento de referencia certificado para la determinación del parámetro en la matriz de interés;
- comparación de los resultados del análisis de un material de referencia certificado con el valor de referencia certificado.

En este caso, para determinar la exactitud del método, se han utilizado dos materiales de referencia de cabello con niveles de mercurio distintos, a saber, el material de referencia certificado NIES CRM N.º 13 (4,42 42 ng/mg) y el material de referencia IAEA-086 (0,573 573 ng/mg).

Para determinar la exactitud de cada nivel, se midieron las distintas concentraciones de mercurio incluidas en la calibración (véase la sección 2.5). Las tasas de recuperación relativas se resumen en la tabla 5.

Las tasas de recuperación, teniendo en cuenta la incertidumbre de medida, deben incluir el 100%. Si no es así, habrá que recalcular el punto de concentración inicial de la curva de calibración según el límite de cuantificación obtenido para el método.

Tabla 5. Concentraciones de mercurio y tasas de recuperación

Concentración (ng Hg)	Recuperación (%)	Intervalo (%)
1	101,7	83,2-131,0
2,5	99,5	88,5-126,2
5	100,9	94,5-135,7
10	98,5	88,2-102,7
15	100,6	97,7-106,7
20	100,4	97,8-103,1
25	99,7	97,1-130,2

Hg = mercurio; ng = nanogramo.

2.8.4. Incertidumbre

Esta se define como el intervalo de confianza general o el rango previsto de los resultados medidos tras tener en cuenta los errores posibles. La incertidumbre de medida típica es equivalente a la desviación típica de una serie de medidas. La incertidumbre de medida típica combinada incluye todas las etapas de trabajo, los factores interferentes y los factores influyentes, así como su influencia mutua. La incertidumbre de medida expandida incluye la función de un intervalo de confianza.

En la tabla 6 se indica la incertidumbre correspondiente a cada concentración de mercurio evaluada.

Tabla 6. Concentraciones de mercurio y nivel de incertidumbre

Concentración (ng Hg)	Incertidumbre (%)
1	18,0
2,5	11,3
5	10,0
10	5,5
15	4,9
20	4,7
25	4,6

Hg = mercurio; ng = nanogramo.

La incertidumbre se ha calculado de acuerdo con las *Directrices de la EA sobre la expresión de incertidumbre en los ensayos cuantitativos (EA guidelines on the expression of uncertainty in quantitative testing) (EA-4/16) (14)* y la *Guía para la expresión de la incertidumbre de medida (15)*.

2.8.5. Límite de cuantificación

El límite de cuantificación inferior indica la concentración mínima de analito que se puede determinar con una incertidumbre predefinida (normalmente del 33%). El límite de cuantificación superior indica la concentración máxima de analito que puede determinarse.

El límite de cuantificación debe estar incluido en la curva de calibración y se puede calcular de varias formas.

Determinación de la relación señal-ruido de fondo

El ruido de fondo puede determinarse de la siguiente manera:

- La intensidad del ruido de fondo (s_0) se determina en relación al analito.
- El límite de detección es tres veces la intensidad media de la señal del ruido de fondo (límite de detección = $3 \times s_0$).
- El límite de cuantificación es nueve veces la intensidad media de la señal del ruido de fondo (límite de cuantificación = $9 \times s_0$).

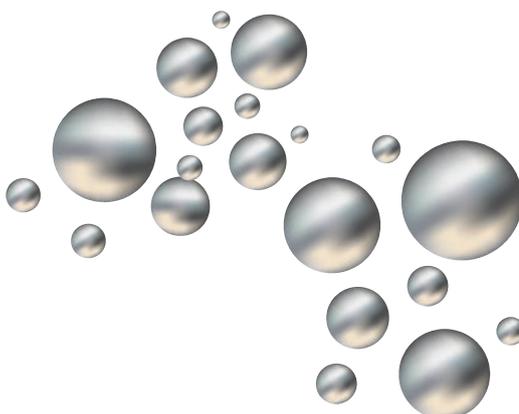
Otros procedimientos

Es preciso advertir que los blancos en las muestras nativas influyen en la elección del método y el enfoque utilizados:

- procedimiento de la desviación típica (de acuerdo con EURACHEM);
- procedimiento del valor del blanco (de acuerdo con DIN 32 645);
- procedimiento de la curva de calibración (de acuerdo con DIN 32 645).

En este procedimiento operativo estándar, el límite de cuantificación se ha calculado utilizando el procedimiento de la curva de calibración y el resultado obtenido es inferior al valor más bajo de la curva de calibración, es decir, una concentración de mercurio de 1 ng, de modo que se aplicará este límite de cuantificación.

Si se considera un peso máximo de la muestra de 100 mg, el límite de cuantificación en términos de la concentración es de 0,01 ng de mercurio/mg de cabello.



3. Interpretación de los resultados

La toxicidad del metilmercurio es un problema grave de la salud pública, ya que la población general se halla expuesta a través de la dieta. La situación es especialmente preocupante en el caso de los fetos, los niños muy pequeños, las mujeres embarazadas y las mujeres en edad fértil, ya que la capacidad del metilmercurio para traspasar la placenta y la barrera hematoencefálica tiene graves repercusiones en el sistema nervioso en desarrollo. A pesar de que los efectos neurológicos del metilmercurio son conocidos desde hace tiempo, la complejidad asociada a la evaluación de los efectos adversos derivados de la exposición crónica a los niveles presentes en el medioambiente dificulta el establecimiento de un valor guía basado en efectos en la salud. Esto se debe en parte a que el intervalo y la magnitud de los efectos neurológicos del metilmercurio varían en función del período de exposición. Se ha observado que los efectos en los adultos se localizan en ciertas zonas del cerebro, mientras que los efectos de la exposición durante la fase de desarrollo son más extensos y generalizados. En este caso, se ven afectados los procesos de división y migración neuronal y se altera la citoarquitectura del cerebro en desarrollo (16 a 18). Esta diferencia en el daño se manifiesta en síntomas clínicos distintos, como pudo observarse claramente en el caso de envenenamiento a gran escala de la población de Minamata. Así, mientras que los adultos exhibían trastornos sensoriales de las extremidades, ataxia, trastornos auditivos y de visión, pérdida de equilibrio, problemas de dicción y, en casos graves, pérdida del conocimiento y muerte, en los niños nacidos después del incidente se observaron repercusiones aún más graves, con una serie de efectos generalizados que incluían casos de discapacidad mental, reflejos deficientes, defectos en las funciones del cerebelo, trastornos nutricionales y del crecimiento, disartria y deformidad de las extremidades y, en el 75% al 95% de los casos, hiperquinesia, sialorrea, estrabismo, y trastornos paroxísticos y del sistema piramidal (19).

A pesar del conocimiento adquirido sobre los efectos del metilmercurio en el ser humano como consecuencia del incidente de Minamata, la situación es muy diferente respecto a la exposición ambiental. Los niveles a los que la población general está expuesta a través del consumo de pescado son considerablemente inferiores a los presentes en el pescado tras el vertido de Minamata, por lo que la evaluación de los efectos adversos resulta extremadamente complicada. Esta complejidad se deriva de la dificultad asociada con la identificación y estimación de los efectos neurológicos, ya que pueden manifestarse de forma sutil e indeterminada, como por ejemplo un coeficiente intelectual reducido. Asimismo, es posible que se produzca una interacción entre los efectos adversos del metilmercurio y los nutrientes presentes en el pescado. El pescado es un alimento de gran calidad que proporciona ácidos poliinsaturados y otros nutrientes esenciales para el correcto desarrollo del sistema nervioso que pueden contrarrestar los efectos adversos del metilmercurio (20, 21). Esta es una de las hipótesis propuestas como explicación a las diferencias observadas en los estudios de las Islas Feroe, Seychelles y Nueva Zelanda. Esta incertidumbre respecto a los efectos derivados de la exposición a niveles bajos se aplica también a otra serie de efectos adversos que se han relacionado con la exposición al metilmercurio (p. ej., los efectos cardiovasculares e inmunológicos) (22).

En vista de lo anterior, resulta complicado interpretar la concentración de mercurio en el cabello, lo cual se refleja en la falta de un valor guía aceptado basado en efectos en salud que respalde la interpretación de los datos.

La interpretación de las concentraciones de mercurio en el cabello requiere la recopilación de datos básicos sobre la exposición al mercurio. Esta información se puede obtener incluyendo preguntas específicas en el cuestionario epidemiológico. Dado que la dieta es una fuente importante de exposición al mercurio ambiental y algunos nutrientes afectan a su absorción, el cuestionario debe contener secciones que la describan (12, 22 a 25). La concentración del metilmercurio en el pescado varía en función de la especie, el tamaño y la zona de captura (26 a 29), por lo que debe solicitarse a los sujetos que indiquen la frecuencia del consumo y el tipo de pescado consumido.

Si asumimos que el cabello crece a un ritmo de 1 cm por mes, la longitud del segmento de cabello analizado ofrecerá información sobre la exposición en distintos períodos. Dado que se pueden producir variaciones estacionales en la dieta y, por consiguiente, en las concentraciones de mercurio en el cabello, es recomendable incluir preguntas sobre la dieta en distintos momentos (p. ej., la frecuencia habitual y durante los tres últimos meses).

3.1. Valores para la interpretación

La definición de los valores de referencia de los estudios de vigilancia biológica humana permite la comparación entre poblaciones. Estos valores representan la concentración de la sustancia química en una población, o subpoblación, concreta como consecuencia de la exposición durante un tiempo específico, y se derivan del análisis de las concentraciones en el cabello, la sangre, la orina u otras matrices biológicas. Los valores de referencia suelen basarse en el percentil 90 o 95 y el correspondiente intervalo de confianza al 95% (30, 31) y pueden ser representativos de la población general o de grupos específicos exclusivamente. No obstante, es necesario revisar y actualizar los valores de referencia, ya que describen una población específica en un momento dado y pueden estar sujetos a la influencia de varios factores, como la edad, la región geográfica, las costumbres y estilos de vida, el polimorfismo genético e incluso la mejora de las técnicas de análisis (32).

Los valores de referencia constituyen una descripción estadística del intervalo típico de concentraciones en las poblaciones de referencia, pero están basados en efectos en la salud (31). Para interpretar los niveles de un compuesto presentes en el organismo desde un punto de vista toxicológico, es necesario definir valores guía basados en efectos en la salud. Si bien la opción preferida deben ser los valores de la vigilancia biológica humana definidos por la Comisión Alemana de Vigilancia Biológica Humana, estos valores se han definido únicamente para un reducido número de compuestos. Dichos valores de vigilancia biológica humana ofrecen una escala clara para la interpretación de los resultados individuales y las medidas que se han de adoptar, dependiendo de si son superiores o inferiores al valor de VBH I o VBH II.

Otros valores basados en efectos en salud útiles para la interpretación de los datos de vigilancia biológica humana son los denominados “equivalentes de la vigilancia biológica”. Estos se definen como la concentración de una sustancia química (o metabolito) en el cabello, la sangre, la orina o en otro tejido acorde con los valores de referencia de la exposición, como la ingesta diaria tolerable (IDT), la dosis de referencia (DRf), la concentración de referencia (CRf) o las dosis según el riesgo específico (26). Sin embargo, estos valores de equivalentes de la vigilancia biológica no ofrecen un valor de corte para distinguir entre la exposición segura y peligrosa, ni predicen los efectos adversos una vez que se excede este valor. En consecuencia, no se deben utilizar para interpretar datos a nivel individual con el fin de predecir el riesgo de efectos adversos (33).

En el caso particular del mercurio en el cabello, no se ha definido un valor de vigilancia biológica humana. No obstante, el valor de vigilancia biológica humana para el mercurio en la sangre establecido por la Comisión Alemana de Vigilancia Biológica Humana se deriva de una concentración de mercurio en el cabello de 5 mg/kg (34) y, por tanto, podría utilizarse para interpretar los niveles de mercurio en el cabello. La tabla 7 presenta los valores de distintos organismos que suelen emplearse para interpretar los niveles de mercurio en el cabello. No obstante, es preciso advertir, que se trata de valores definidos para grupos vulnerables (niños, mujeres en edad fértil y embarazadas), no para la población general.

Además de los valores de la tabla 7, se pueden comparar los datos obtenidos con valores de referencia (percentil 95) procedentes de otros estudios; no obstante, teniendo en cuenta los comentarios anteriores sobre los valores de referencia, es conveniente que las poblaciones sean lo más comparable posible (es decir, mismo grupo de edad, estilos de vida similares, proximidad temporal, etc.).

Tabla 7. Concentraciones de mercurio y nivel de incertidumbre

Organismo	Niveles del cabello	Referencia
Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US EPA)	1,0 µg/g	(35)
Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA)	1,9 µg/g	(29)
Agencia Alemana de Medio Ambiente (UBA)	5,0 µg/g	(34)

Referencias

1. Harkins D. K., Susten A. S. "Hair analysis: exploring the state of the science". *Environ Health Perspect.* 2003, n.º 111, págs. 576 a 578. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1241447/pdf/ehp0111-000576.pdf> (consultado el 31 de enero de 2018).
2. Srogi K. "Mercury content of hair in different populations relative to fish consumption". *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology.* 2007, n.º 189, págs. 107 a 130. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17193738> (consultado el 31 de enero de 2018).
3. McDowell M. A., Dillon C. F., Osterloh J., Bolger P. M., Pellizzari E., Fernando R. *et al.* "Hair mercury levels in U.S. children and women of childbearing age: reference range data from NHANES 1999-2000". *Environ Health Perspect.* 2004, n.º 112, págs. 1165 a 1171. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1247476/> (consultado el 31 de enero de 2018).
4. Harkey M. R. "Anatomy and physiology of hair". *Forensic Science International.* 1993, n.º 63, págs. 9 a 18. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8138238> (consultado el 31 de enero de 2018).
5. Tobin D. J. *Hair in toxicology: An important bio-monitor.* Cambridge: RSC Publishing; 2005.
6. © Instituto de Salud Carlos III [sitio web]. Madrid: Instituto de Salud Carlos III; 2018. Disponible en http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-el-instituto/fd-organizacion/fd-estructura-directiva/fd-subdireccion-general-servicios-aplicados-formacion-investigacion/fd-centros-unidades/fd-centro-nacional-sanidad-ambiental/fd-servicios-cientifico-tecnicos_sanidad-ambiental/sc-t-cnsa-toxicologia-ambiental.shtml (consultado el 31 de enero de 2018).
7. Esteban M., Schindler B. K., Jiménez-Guerrero J. A., Koch H. M., Angerer J., Rosado M. *et al.* "Mercury analysis in hair: Comparability and quality assessment within the transnational COPHES/DEMOCOPHES project". *Environmental Research.* 2014, n.º 141, págs. 24 a 30. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25483984> (consultado el 31 de enero de 2018).
8. Jiménez-Guerrero J. A., Navarro C., Cañas A., Lucena M. A., Castaño A. "Development, validation and ISO/IEC 17025:2005 accreditation of an atomic absorption method to determine total mercury in human hair". Octavo Simposio Internacional sobre la Vigilancia Biológica de la Salud Ocupacional y Ambiental, Espoo, Finlandia, 6 a 8 de septiembre de 2010.
9. Veiga M. M., Baker R. F. *Protocols for environmental and health assessment of mercury released by artisanal and small-scale gold miners.* Viena: Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial; 2004.
10. Li Y. F., Chen C., Li B., Wang J., Gao Y., Zhao Y., Chai Z. "Scalp hair as a biomarker in environmental and occupational mercury exposed populations: suitable or not?" *Environmental Research.* 2008, n.º 107, págs. 39 a 44. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013935107001430?via%3Dihub> (consultado el 31 de enero de 2018).
11. Fewtrell L., Kaufmann R., Prüss-Üstün A., editores. Lead: Assessing the environmental burden of disease at national and local levels. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2003. Disponible en http://www.who.int/quantifying_ehimpacts/publications/en/leadebd2.pdf (consultado el 31 de enero de 2018).
12. *Guidance for identifying populations at risk from mercury exposure.* Ginebra: Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente y Organización Mundial de la Salud; 2008. Disponible en <http://www.who.int/foodsafety/publications/risk-mercury-exposure/en/> (consultado el 31 de enero de 2018).

13. DMA 80. En: Milestone [sitio web]. Sorisole: Milestone; 2018 (<https://www.milestonesrl.com/en/mercury/dma-80/>, fecha de acceso: 31 de enero de 2018).
14. EA guidelines on the expression of uncertainty in quantitative testing (EA-4/16). European Accreditation; 2003. Disponible en <http://www.european-accreditation.org/publication/ea-4-16-g-rev00-december-2003-rev> (consultado el 19 de enero de 2018).
15. Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement. Grupo de Trabajo 1 del Comité Conjunto para el Desarrollo de Guías de Metrología (JCGM/WG 1); 2008. Disponible en https://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM_100_2008_E.pdf (consultado el 19 de enero de 2018).
16. Clarkson T. W. “Mercury: major issues in environmental health”. *Environ Health Perspect.* 1992, n.º 100, págs. 31 a 38. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1519577/> (consultado el 31 de enero de 2018).
17. Castoldi A. F., Coccini T., Ceccatelli S., Manzo L. “Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury”. *Brain Research Bulletin.* 2001, n.º 55, págs. 197 a 203. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11470315> (consultado el 31 de enero de 2018).
18. Johansson C., Castoldi A. F., Onishchenko N., Manzo L., Vahter M., Ceccatelli S. “Neurobehavioural and molecular changes induced by methylmercury exposure during development”. *Neurotoxicity Research.* 2007, n.º 11, págs. 241 a 260. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17449462> (consultado el 31 de enero de 2018).
19. Harada M. “Congenital Minamata disease: Intrauterine methylmercury poisoning”. *Teratology.* 1978, n.º 18, págs. 285 a 288. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/362594> (consultado el 31 de enero de 2018).
20. Myers G. J., Davidson P. W., Strain J. J. “Nutrient and methyl mercury exposure from consuming fish”. *Journal of Nutrition.* 2007, n.º 137, págs. 2805 a 2808. Disponible en https://pdfs.semanticscholar.org/d543/5eed77f9079b1057c_bd5a66b28d8f7778fd6.pdf (consultado el 31 de enero de 2018).
21. Choi A. L., Cordier S., Weihe P., Grandjean P. “Negative confounding in the evaluation of toxicity: the case of methylmercury in fish and seafood”. *Critical Reviews in Toxicology.* 2008, n.º 38, págs. 877 a 893. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2597522/> (consultado el 31 de enero de 2018).
22. Karagas M. R., Choi A. L., Oken E., Horvat M., Schoeny R., Kamai E. *et al.* “Evidence on the human health effects of low-level methylmercury exposure”. *Environ Health Perspect.* 2012, n.º 120, págs. 799 a 806. Disponible en <https://ehp.niehs.nih.gov/1104494/> (consultado el 31 de enero de 2018).
23. Champan L., Chan H. M. “The influence of nutrition on methylmercury intoxication”. *Environ Health Perspect.* 2000, n.º 108, suplemento 1, págs. 29 a 56. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1637774/> (consultado el 31 de enero de 2018).
24. Chen C. Y., Serrel N., Evers D. C., Fleishman B. J., Lambert K. F., Weiss J. *et al.* “Meeting report: Methylmercury in marine ecosystems – from sources to seafood consumers”. *Environ Health Perspect.* 2008, n.º 116, págs. 1706 a 1712. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2599767/> (consultado el 31 de enero de 2018).
25. Castaño A., Cutanda F., Esteban M., Pärt P., Navarro C., Gómez S. *et al.* “Fish consumption patterns and hair mercury levels in children and their mothers in 17 EU countries”. *Environmental Research.* 2015; 141:58-68. doi: 10.1016/j.envres.2014.10.029.
26. Consejo Nacional de Investigaciones. “Toxicological effects of methylmercury”. Washington D. C.: National Academy Press; 2000. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK225778/> (consultado el 31 de enero de 2018).

28. Burger J., Gochfeld M. "Mercury and selenium levels in 19 species of saltwater fish from New Jersey as a function of species, size, and season". *Science of The Total Environment*. 2011, n.º 409, págs. 1418 a 1429. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4300121/> (consultado el 31 de enero de 2018).
29. Miniero R., Abate V., Brambilla G., Davoli E., De Felip E., De Filippis S. P. *et al.* "Persistent toxic substances in Mediterranean aquatic species". *Science of The Total Environment*. 2014; vol. 494 y 495, págs. 18 a 27. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969714008237?via%3Dihub> (consultado el 31 de enero de 2018).
30. Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. "Scientific opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food". *EFSA Journal*. 2012; 10(12):2985. Disponible en <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2012.2985/abstract> (consultado el 31 de enero de 2018).
31. Poulsen O. M., Holst E., Christensen J. M. "Calculation and application of coverage intervals for biological reference values". *Pure and Applied Chemistry*. 1997, n.º 69, págs. 1601 a 1611 (<https://doi.org/10.1351/pac199769071601>, fecha de consulta: 31 de enero de 2018).
32. Ewers U., Krause C., Schulz C., Wilhelm M. "Reference values and human biological monitoring values for environmental toxins". *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 1999, n.º 72, págs. 255 a 260 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10491780>, fecha de consulta: 31 de enero de 2018).
33. Manini P., De Palma G., Mutti A. "Exposure assessment at the workplace: Implications of biological variability". *Toxicology Letters*. 2007, n.º 168, págs. 210 a 218 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17157456>, fecha de consulta: 31 de enero de 2018).
34. Hays M. S., Aylward L. L. "Interpreting human biomonitoring data in a public health risk context using Biomonitoring Equivalents". *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2012, n.º 215, págs. 145 a 148 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438463911002331?via%3Dihub>, fecha de consulta: 31 de enero de 2018).
35. UBA. Substance monograph: Mercury – reference values and human biomonitoring (HBM) levels. Opinión de la Comisión de Vigilancia Biológica Humana de la Agencia Alemana de Medio Ambiente. Dessau-Roßlau: Umweltbundesamt; 1999.
36. *Mercury study report to congress*. "Vol. IV: An assessment of exposure to mercury in the United States". Washington D. C.: Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US EPA); 1997 (<https://www3.epa.gov/airtoxics/112nmerc/volume4.pdf>, fecha de acceso: 31 de enero de 2018).
37. "Evaluation of certain food additives and contaminants. WHO Technical Report Series 922. Sixty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives". Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2004 (http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42849/1/WHO_TRS_922.pdf, fecha de consulta: 31 de enero de 2018).

Anexo 2. Cuestionario para la toma de muestras de cabello

Código de ID:

Fecha de la entrevista:

Punto de toma de muestras:

Trabajador de campo:

1. Muestra obtenida

Sí No Razones:

2. Fecha de toma (dd/mm/aaaa): ____/____/____

3. Color natural del cabello:

Negro Pelirrojo
 Castaño oscuro Gris
 Castaño Cano
 Rubio

4. Estructura natural del cabello:

Straight
 Wavy
 Curly

5. ¿Se ha teñido el cabello durante los últimos seis meses?

No Sí Hace meses
 Hace semanas

6. ¿Se ha hecho algún tratamiento en el cabello en el último año, por ejemplo, se ha alisado o aplicado una permanente?

No Sí Hace meses
 Hace semanas

7. Último lavado del cabello:

Hace días Especificar

Ayer

Hoy

8. Longitud de la muestra de cabello (desde el cuero cabelludo): _____ cm

9. Etiquetado de la muestra:

Sí No Razones

10. Comentarios:

Nota. Este cuestionario solo recoge la información básica sobre la muestra de cabello. No incluye la información relativa a la exposición al mercurio.

Anexo 3. Registro de recepción de muestras

1. ORIGEN DE LA MUESTRA:

Centro:

Ciudad/país:

Fecha de toma de la muestra:

2. MUESTRA RECIBIDA:

Cabello

Firma del revisor:

3. RECEPCIÓN DE MUESTRA:

Fecha
(dd/mm/aa)

Hora
(hh:mm)

A) EMBALAJE

NINGÚN PROBLEMA DETECTADO

PROBLEMAS DETECTADOS:

Cooling Embalaje dañado

Agentes refrigerantes descongelados

Otros: _____

B) MUESTRAS

NINGÚN PROBLEMA DETECTADO

PROBLEMAS DETECTADOS:

Cantidad o volumen insuficientes (*especificar la matriz*)__

Discrepancia en los códigos de ID

Otros: _____

C) DOCUMENTOS

NINGÚN PROBLEMA DETECTADO

PROBLEMAS DETECTADOS:

Falta el registro de muestras tomadas

Falta el cuestionario de toma de muestras de cabello

Falta el cuestionario del estudio

Discrepancia en los códigos de ID

Otros: _____

4. FECHA DE ALMACENAMIENTO O DEPÓSITO EN BIOBANCO:

5. COMENTARIOS:

CÓDIGOS DE ID PARA MUESTRAS RELACIONADAS

Sangre de cordón umbilical

Orina

Anexo 4. Lista de verificación previa a la toma de muestras

1. ¿Están preparado el material necesario para la toma de muestras?

- Alcohol y algodón
- Guantes de látex
- Tijeras
- Etiquetas de identificación
- Rotulador de tinta indeleble
- Cinta adhesiva
- Bolsas de papel
- Bolsas de plástico con cierre hermético

2. ¿Están preparados todos los documentos utilizados en la toma de muestras?

- Registro de muestras tomadas
- Cuestionarios de toma de muestras de cabello
- Formulario de consentimiento informado

3. Observaciones

.....

.....

Anexo 5. Lista de verificación posterior a la toma de muestras

1. ¿Se han etiquetado correctamente todas las muestras y se han detallado en el registro de muestras obtenidas?

Sí No

Describe cualquier problema detectado y la solución:
.....
.....

2. ¿Están todos los formularios de consentimiento informado firmados y etiquetados?

Sí No

Describe cualquier problema detectado y la solución:
.....
.....

3. ¿Están todos los cuestionarios de toma de muestras cumplimentados y etiquetados correctamente?

Sí No

Describe cualquier problema detectado y la solución:
.....
.....

4. ¿Se corresponden los códigos de ID de las muestras y los documentos?

Sí No

Describe cualquier problema detectado y la solución:
.....
.....

Procedimiento operativo estándar para la determinación de mercurio en sangre de cordón umbilical

(toma de muestras, análisis de la concentración de mercurio total, interpretación de resultados)

Resumen

En el presente procedimiento operativo estándar se describe el proceso de evaluación de la exposición al mercurio a través de la vigilancia biológica humana mediante el uso de sangre de cordón umbilical como matriz biológica. En él se detalla el proceso de toma de muestras de sangre de cordón umbilical, análisis de la concentración de mercurio total e interpretación de los resultados.

Palabras clave

Mercurio: análisis
Compuestos de metilmercurio: análisis
Biomarcadores: análisis
Sangre fetal: química
Cordón umbilical: química
Exposición materna
Intercambio maternofetal
Bebé, recién nacido
Exposición ambiental

Colaboradores

Milena Horvat
Instituto Jožef Stefan, Eslovenia
Darja Mazej
Instituto Jožef Stefan, Eslovenia
Majda Palvin
Instituto Jožef Stefan, Eslovenia
Greet Schoeters
VITO, Boeretang, Bélgica
Janja Snoj Tratnik
Instituto Jožef Stefan, Eslovenia

Índice

Abreviaturas.....	75
Introducción: la sangre de cordón umbilical como matriz para la vigilancia biológica humana del mercurio.....	76
1. Toma de muestras de sangre del cordón umbilical	77
1.1. Alcance del método.....	77
1.2. Medidas de seguridad	77
1.3. Material necesario	77
1.4. Preparación o tratamiento previo del material de toma de muestras.....	78
1.5. Procedimiento de toma de muestras.....	78
1.6. Etiquetado	79
1.7. Transporte y conservación de las muestras	79
1.8. Recepción de muestras	79
1.9. Preparación de alícuotas de las muestras.....	80
1.10. Almacenamiento y conservación	81
1.11. Control de calidad: trazabilidad.....	81
2. Análisis de la concentración de mercurio total presente en la sangre de cordón umbilical	81
2.1. Alcance del método.....	82
2.2. Fundamento teórico	82
2.3. Medidas de seguridad	83
2.4. Equipo, materiales y soluciones	83
2.5. Calibración	85
2.6. Procedimiento	85
2.7. Control de calidad.....	89
2.8. Evaluación del método	90
3. Interpretación de los resultados	94
Referencias	96
Anexo 1. Cuestionario para la toma de muestras de sangre de cordón umbilical	98
Anexo 2. Registro de recepción de muestras.....	99

Abreviaturas

Hg	mercurio
ID	identificación
LDD	límite de detección
LDC	límite de cuantificación
POE	procedimiento operativo estándar

Introducción: la sangre de cordón umbilical como matriz para la vigilancia biológica humana del mercurio

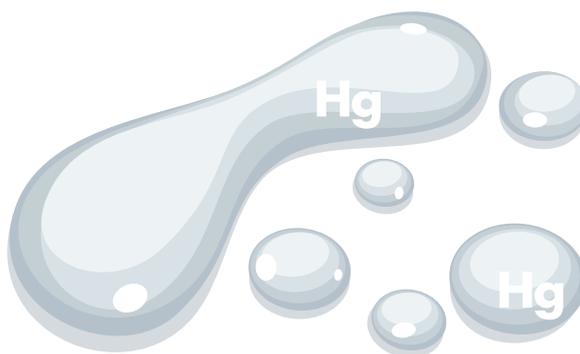
El mercurio (Hg) es un contaminante tóxico y persistente que se bioacumula y se biomagnifica a través de la cadena trófica (1, 2). Las personas están expuestas al metilmercurio principalmente a través de su dieta, en especial por el consumo de pescados de agua dulce y marinos (3). También pueden estar expuestas al mercurio elemental o inorgánico a través de su inhalación durante actividades ocupacionales y a causa de las amalgamas dentales (4), así como por el uso de algunas cremas y jabones blanqueadores de la piel, su utilización en medicina tradicional y en ciertas prácticas culturales o el derrame accidental de mercurio en el hogar, la escuela u otros lugares (5).

Aunque la población general se encuentra expuesta a niveles bajos de mercurio, la incidencia y la gravedad de sus efectos sobre la salud dependen de su forma química, la dosis, la edad o la etapa del desarrollo de quienes están expuestos (se considera que el feto es el más vulnerable), así como de la duración y la vía de exposición (1, 6).

La toxicidad del mercurio afecta principalmente al sistema nervioso, los riñones y el sistema cardiovascular, siendo los órganos en desarrollo (como el sistema nervioso del feto) los más sensibles a sus efectos tóxicos. Los efectos sobre el sistema nervioso constituyen el criterio de valoración toxicológico más sensible tras la exposición a mercurio elemental y a metilmercurio, mientras que en el caso de la exposición a compuestos de mercurio inorgánico son las afecciones renales (1).

La selección de matrices biológicas para evaluar la exposición humana a mercurio depende de los compuestos de este metal, los patrones de exposición (por ejemplo, crónica, aguda) y el tiempo transcurrido entre la exposición y la toma de la muestra (7). La presencia de mercurio en la sangre representa la exposición a mercurio orgánico e inorgánico a corto plazo, y no proporciona información sobre la exposición a largo plazo y sus variaciones (7 a 9). Los niveles de mercurio en la sangre de cordón umbilical y en cabello constituyen biomarcadores adecuados de la exposición prenatal a bajas concentraciones de metilmercurio debido a su transferencia selectiva a través de barreras biológicas como la sangre o el cabello y la placenta, mientras que el mercurio inorgánico no cuenta con esta propiedad. Los niveles en sangre de cordón umbilical son proporcionales a los observados en la sangre materna, aunque ligeramente superiores (10, 11). El mercurio en la sangre de cordón umbilical es preferible como biomarcador de la exposición prenatal, ya que aporta información tanto sobre la exposición de la madre como de la exposición prenatal del niño (12).

El mercurio en sangre de cordón umbilical presenta una mejor asociación con el déficit neuroconductual infantil relacionado con el mercurio, en comparación con los niveles de mercurio en el cabello materno (13). La concentración de mercurio en el cabello puede verse afectada por varios factores, como el color del cabello y su velocidad de crecimiento, lo que limita su utilidad como indicador de concentraciones de mercurio en el organismo (14). La sangre de cordón umbilical es una matriz no invasiva, pero es necesario que una enfermera la recoja tras el nacimiento.



1. Toma de muestras de sangre de cordón umbilical

1.1. Alcance del método

La toma de sangre de cordón umbilical debe realizarse inmediatamente después del parto, en una sala de partos. Para ello pueden emplearse dos métodos básicos:

- La toma de sangre de cordón umbilical después del nacimiento del bebé, pero antes de la expulsión de la placenta; este método se denomina “*in utero*” y, por lo general, lo lleva a cabo un médico o una matrona.
- La obtención de sangre del cordón umbilical después de la expulsión de la placenta y el pinzamiento del cordón umbilical se denomina “*ex utero*”. Este método puede aplicarse en una zona separada y ser realizado por el personal de enfermería o de investigación.

La OMS recomienda que para la toma de muestras de sangre de cordón umbilical se empleen únicamente métodos “*ex utero*”, a fin de evitar posibles problemas en la madre y el niño.

1.2. Medidas de seguridad

Todas las precauciones necesarias para trabajar con muestras de sangre son aplicables a la obtención de sangre de cordón umbilical.

- Utilizar productos diseñados específicamente para la toma de sangre de cordón umbilical; si se emplea una aguja y una jeringa, usar una aguja de seguridad que pueda separarse del tubo de la jeringa.
- Al recoger sangre de cordón umbilical, siempre deben utilizarse guantes.
- Si los guantes se pincharan o se contaminaran mucho durante su uso, hay que quitarlos y desecharlos, lavarse las manos y ponerse guantes limpios.
- Al terminar de manipular las muestras, deben quitarse los guantes, desecharlos y lavarse las manos.
- Si es necesario, usar desinfectantes.

1.3. Material necesario

Los materiales necesarios para tomar la muestra de sangre de cordón umbilical son los siguientes:

- hojas de registro de las muestras;
- materiales para la toma de las muestras:
 - agujas y jeringas;
 - tubo B1: tubo de polipropileno de 50 ml con 0,5 ml de ácido etilendiaminotetraacético (AEDT);
 - tubo B2: tubo de polipropileno de 10 ml libre de metales.

Antes de la toma de muestras, el hospital debe preparar cajas de tubos de toma de muestras debidamente etiquetados, preparadas por un laboratorio de investigación.

Deben proporcionarse los datos de contacto del personal de investigación, así como las instrucciones de recogida, almacenamiento y transporte de las muestras.

1.4. Preparación o tratamiento previo del material de toma de muestras

Todos los tubos deben lavarse con una solución de ácido nítrico al 10% en agua purificada, a fin de eliminar la contaminación de fondo. A continuación, se describen los detalles de este procedimiento.

1. Prepare una solución de ácido nítrico al 10% con ácido nítrico (65% extrapuro) y agua purificada.
2. Vierta la solución en un tanque.
3. Abra los tubos e introduzca los tubos y los tapones en el tanque. Compruebe que queden completamente sumergidos.
4. Los tubos deben permanecer sumergidos en el tanque durante al menos tres horas (preferiblemente toda la noche).
5. Extraiga los tubos del tanque con ácido y aclárelos en un tanque con agua purificada. Agítelos durante 2 o 3 minutos. A continuación, traspase los tubos y los tapones a un segundo tanque de agua purificada. Vuelva a agitarlos 2 o 3 minutos.
6. Retire los tubos y los tapones y colóquelos boca abajo sobre un papel de filtro limpio para que se sequen.
7. Una vez secos, tape los tubos pretratados con ácido nítrico. Efectúe una marca en el tubo B1 para indicar la cantidad mínima de sangre del cordón umbilical (10 ml). Introduzca el recipiente pretratado en una bolsa de plástico con cierre hermético.

La solución ácida puede ser utilizada hasta un mes después de su preparación. Todos los procedimientos deben llevarse a cabo en una campana de gases químicos y usando el equipo protector adecuado.

Tras el procedimiento de limpieza, deben seleccionarse al azar el 5% de los tubos y analizarlos para comprobar la ausencia de contaminación por mercurio. Para ello, llenar los tubos con agua purificada y agitarlos durante 10 minutos. Analizar una alícuota para detectar si están presentes los biomarcadores en cuestión (mercurio total).

1.5. Procedimiento de toma de muestras

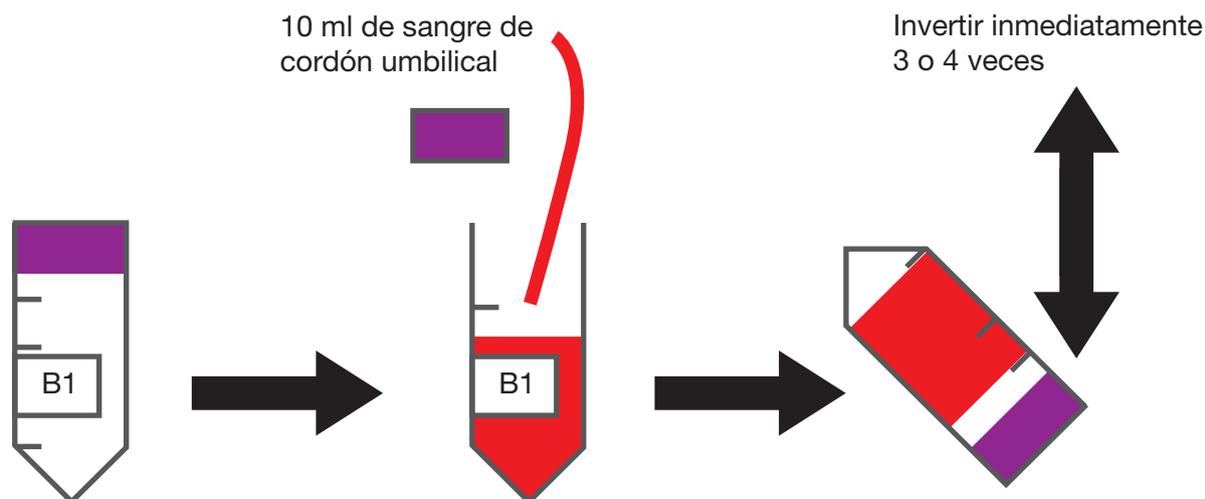
A continuación, se describe el procedimiento “*ex utero*” de toma de sangre de cordón umbilical.

1. Tras el pinzamiento del cordón umbilical y su separación del bebé y la placenta, limpie durante al menos 30 segundos, la sangre materna que quede en el cordón umbilical con una gasa mojada en alcohol o un líquido antiséptico a base de yodo, en el lugar en que efectuará la venopunción (la vena). La esterilización del cordón umbilical en la zona de la punción es muy importante, ya que evita la contaminación de la sangre del cordón umbilical.
2. Deje secar el lugar de la venopunción.
3. Retire los capuchones de las agujas y déjelos cerca, ya que tendrá que volver a cubrir las agujas al finalizar el procedimiento de toma.
4. Pinche la vena del cordón umbilical en el lugar esterilizado, dejando que la sangre fluya hacia el interior de la jeringa.
5. Cuando la jeringa esté llena, reemplace la aguja por una más fina e insértela en el tapón del tubo Vacutainer para que la sangre fluya hacia el interior del tubo.
6. Si el flujo de sangre se detiene, esterilice otra zona más cercana a la placenta y use otra aguja para seguir tomando sangre.
7. Al finalizar el procedimiento de toma, cubra las agujas con sus capuchones para evitar accidentes.
8. Espere 10 minutos. Invierta el tubo con suavidad para mezclar bien la muestra de sangre.

La sangre de cordón umbilical debe recogerse y etiquetarse tal y como se detalla a continuación (véase la figura 1).

1. Tome la sangre de cordón umbilical en el tubo B1 (mínimo 10 ml).
2. Tubo B1: inviértalo 3 o 4 veces para que la sangre se mezcle con el AEDT.
3. Coloque el tubo B1 en la bolsa con cierre hermético y llévelo al laboratorio.
4. Rellene el cuestionario de toma de muestras (anexo 1).

Figura 1. Toma de sangre de cordón umbilical



Registre la información sobre la participante en el formulario de registro (anexo 2). Deben documentarse los siguientes datos:

- el nombre de la participante;
- el código de identificación (ID) de la muestra;
- la fecha y hora del nacimiento;
- la hora de inicio y finalización de la toma de sangre de cordón umbilical;
- el volumen de sangre de cordón umbilical tomado.

El cuestionario debe remitirse al centro de coordinación o al coordinador del estudio.

1.6. Etiquetado

La bolsa de plástico, los cuestionarios y todos los tubos de toma de muestras deben etiquetarse con el código de identificación de la participante.

1.7. Transporte y conservación de las muestras

Las muestras deben enviarse al laboratorio del hospital local u otro lugar del hospital especialmente destinado a su almacenamiento durante las primeras dos horas tras su toma. Durante el transporte, las muestras deben conservarse en un refrigerador o un embalaje térmico, a una temperatura inferior a 4 °C.

1.8. Recepción de muestras

Los criterios para la aceptación o el rechazo de una muestra se deben definir por adelantado y aplicar durante la recepción de las muestras. Dichos criterios deben centrarse en las condiciones de

transporte, la documentación complementaria, la integridad de los envases, la correcta identificación y la cantidad de muestra (suficiente para el análisis y almacenamiento en biobanco, si las muestras se van a almacenar con otros fines de investigación).

Al recibir las muestras de sangre de cordón umbilical, deben comprobarse los puntos siguientes:

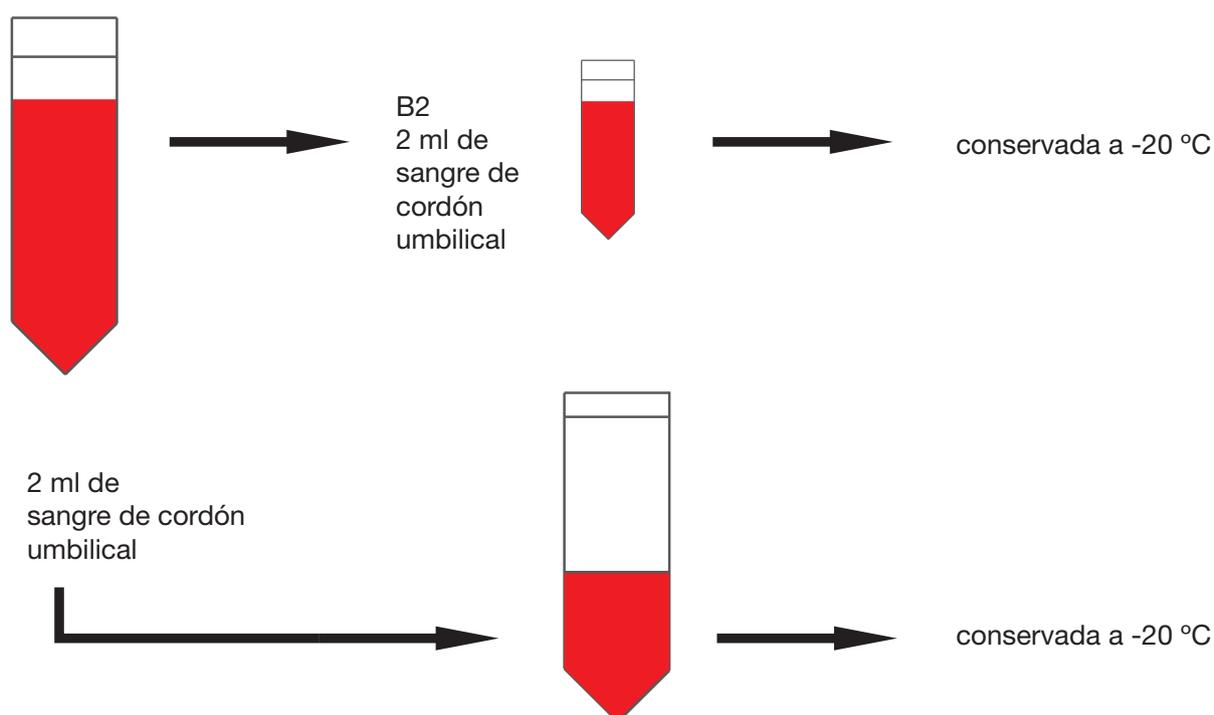
- Volumen y calidad de las muestras: no deben aceptarse especímenes de menos de 0,25 ml.
- Sospechas de contaminación: debido a procedimientos o dispositivos de toma inadecuados.
- Integridad del embalaje: debe estar cerrado correctamente y no presentar signos de manipulación (nota: se puede colocar un sello de seguridad en el embalaje en el lugar del muestreo).
- Documentos adjuntos: el embalaje debe incluir todas las muestras enumeradas en el registro de muestras tomadas y estas deben ir acompañadas de los documentos correspondientes (cuestionarios, etc.).
- Identificación correcta: las muestras y documentos recibidos deben estar identificados adecuadamente con el código de ID correspondiente.

1.9. Preparación de alícuotas de las muestras

La preparación de las alícuotas puede realizarse en el laboratorio de un hospital, en una atmósfera libre de mercurio. El laboratorio del hospital debe preparar con antelación las cajas con los tubos etiquetados para las alícuotas. Para medir el contenido de mercurio, el volumen óptimo de la muestra es de entre 1 - 2 ml (el volumen mínimo es de 0,5 ml). Si se desea almacenar cantidades superiores, se recomienda conservar alícuotas de 1 - 2 ml en tubos diferentes, en lugar de volúmenes mayores en un único tubo. La descongelación frecuente de la sangre puede producir pérdidas de mercurio.

La figura 2 ilustra el proceso de preparación y almacenamiento de las alícuotas. Para el análisis del contenido de mercurio, se almacenará en el tubo B2 una alícuota de 2 ml de sangre de cordón umbilical a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se almacena un tubo Corning (B1) con la sangre restante, por si fuera necesario repetir el análisis del contenido de mercurio o analizar la presencia de otros contaminantes (en el caso de que las muestras se almacenen con otros fines de investigación).

Figura 2. Distribución y almacenamiento de la muestra en alícuotas



1.10. Almacenamiento y conservación

Todas las alícuotas de la muestra deben almacenarse en un congelador a -20°C hasta el momento de su análisis. Se ha demostrado que las muestras conservadas a -20°C se mantienen estables durante varios meses y que a -70°C , se conservan varios años.

1.11. Control de calidad: trazabilidad

La trazabilidad de las muestras a lo largo del estudio es un aspecto crucial y por ello, deben tomarse las medidas necesarias para garantizarla. La sangre de cordón umbilical debe etiquetarse con el código de ID. Como se ha mencionado anteriormente, es fundamental etiquetar correctamente las muestras y los documentos relacionados, pero también es necesario poder vincular las muestras con la información facilitada por los voluntarios. Para ello, todos los documentos relacionados con las muestras (cuestionarios, registros, etc.) deben etiquetarse inmediatamente con el mismo código de ID que la muestra.

2. Análisis de la concentración de mercurio total presente en la sangre de cordón umbilical

La determinación de la concentración de mercurio total en sangre de cordón umbilical requiere emplear métodos analíticos sensibles y un control de calidad adecuado. Existen numerosos métodos para analizar la concentración de mercurio total en la sangre humana, algunos de los cuales están automatizados. En principio, pueden clasificarse en dos categorías: (1) los métodos basados en la digestión ácida seguida de espectrometría de absorción atómica de vapor frío, espectroscopia de fluorescencia atómica de vapor frío o espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente; y (2) los métodos basados en la descomposición térmica y la espectrometría de absorción atómica de vapor frío. El método descrito en el presente procedimiento operativo estándar se basa en el segundo principio, que combina la combustión, la amalgamación del mercurio con oro y la detección mediante espectroscopia de absorción atómica. Permite determinar de manera exacta y fiable la concentración de mercurio total en las muestras de sangre en el rango de concentración típico observado en el ámbito de la exposición ambiental y ocupacional. Para efectuar estas medidas se requiere un instrumento específico, tal como se describe más adelante. Si el laboratorio no dispusiera de él, puede utilizar el procedimiento para evaluar la concentración de mercurio total en la orina descrito en el procedimiento operativo estándar u otro similar (15).

Un gran número de laboratorios emplean también la técnica propuesta en las directrices preparadas por el Instituto Nacional para la Enfermedad de Minamata (Japón) (15). En el presente procedimiento operativo estándar se propone este método para evaluar la cantidad total de mercurio en la orina, que también puede usarse para la sangre. Se trata de un método sencillo, sensible, eficiente y, sobre todo, de bajo costo, ya que únicamente requiere un sencillo equipo que emplea aire atmosférico como gas portador.

No requiere la extracción o el tratamiento previo de las muestras, produce muy pocos residuos químicos y el riesgo de contaminación es mínimo.

Si el laboratorio dispone de un equipo alternativo para la detección de mercurio en muestras digeridas en ácido, es recomendable seguir las recomendaciones del fabricante del instrumento. Las instrucciones para la toma y la manipulación de muestras incluidas en el presente procedimiento operativo estándar son adecuadas independientemente del instrumental utilizado para la detección del mercurio. Es necesario comprobar el límite de detección y el límite de cuantificación para evaluar si resultan adecuados para las muestras de sangre.

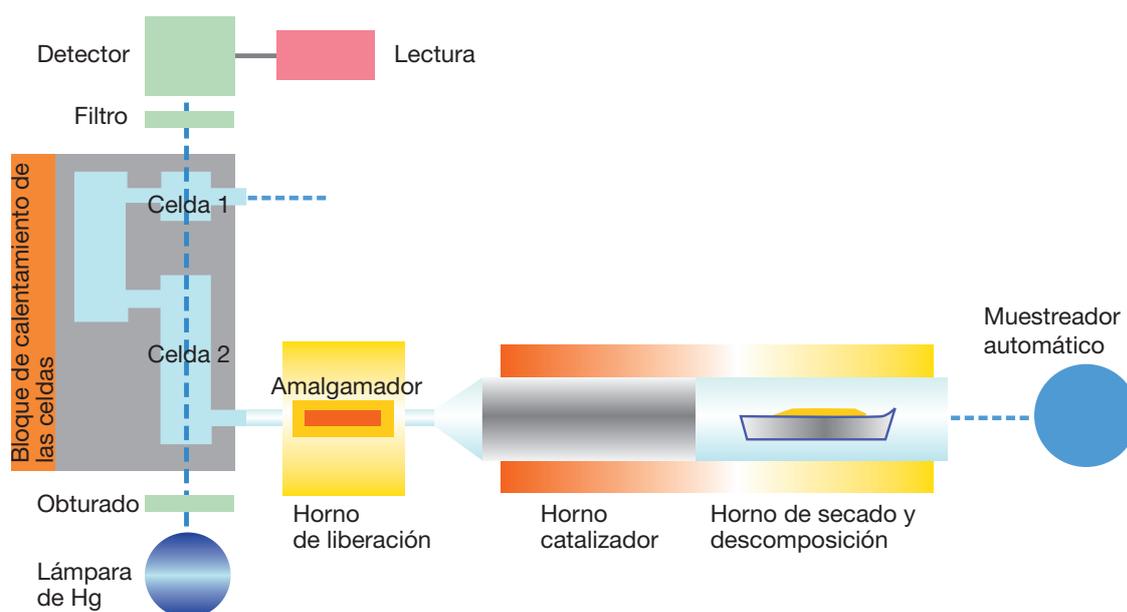
2.1. Alcance del método

El método descrito en el presente procedimiento operativo estándar tiene por objeto determinar la concentración de mercurio total presente en la sangre total de cordón umbilical. En el caso de una muestra de 200 mg, el límite de cuantificación es de 0,2 ng/ml. La concentración de mercurio total en la sangre de cordón umbilical de las personas que no consumen pescado normalmente oscila entre 0,5 y 5,0 ng/ml. Si el consumo de pescado es mayor, con frecuencia se detectan valores superiores a 10 ng/ml. El método descrito en el presente procedimiento operativo estándar puede abarcar todos los intervalos observados habitualmente.

2.2. Fundamento teórico

En este procedimiento operativo estándar se determina el mercurio presente en la sangre mediante espectroscopia de absorción atómica con descomposición térmica y amalgamación con oro, una técnica analítica muy sensible y selectiva, especialmente adecuada para el análisis de trazas. Las muestras de sangre se pesan e introducen en la navecilla de prueba sin tratamiento previo. A continuación, se inserta la muestra en el analizador directo de mercurio (figura 3), donde primero se seca y después se descompone térmicamente en presencia de un flujo continuo de oxígeno. Los productos de la descomposición son transportados mediante el flujo de oxígeno hasta la sección catalítica del horno. Los vapores de mercurio quedan retenidos en un amalgamador en oro; a continuación se calientan y se liberan, llegando así a la celda de absorción del espectrofotómetro de absorción atómica. El contenido de mercurio se determina mediante espectrometría de absorción atómica a 253,7 nm.

Figura 3. Analizador directo de mercurio



Hg = mercurio.

Nota: la versión estándar de Milestone DMA-80 (en la ilustración) está equipada con dos celdas de medida, una lámpara de mercurio y un detector de mercurio.

Fuente: Milestone (13).

La determinación cuantitativa del contenido de mercurio se lleva a cabo mediante una curva de calibración obtenida con soluciones patrón de mercurio. El analizador directo del mercurio se puede configurar de diversas maneras dependiendo del tipo de modelo utilizado. En el procedimiento aquí descrito se utilizó una celda de medida que abarca un intervalo de trabajo de entre 0 y 20 ng de mercurio (intervalo bajo).

2.3. Medidas de seguridad

Al analizar la concentración de mercurio total en sangre de cordón umbilical deben adoptarse las siguientes medidas de seguridad:

- Colocar todos los objetos de plástico, vidrio y papel (por ejemplo, las puntas de pipeta, los tubos del muestreador automático y los guantes) que entrarán en contacto con fluidos biológicos humanos, como la sangre, en una bolsa de autoclave para sustancias biológicas peligrosas. Mantener estas bolsas en los contenedores apropiados hasta que se sellen y se esterilicen en el autoclave.
- Al manipular las soluciones, se deben utilizar guantes, bata de laboratorio y gafas de seguridad.
- Prestar especial atención al manipular el ácido clorhídrico concentrado, ya que es un producto químico cáustico que puede causar lesiones graves en la piel y los ojos.
- Entre los posibles riesgos asociados con la utilización del equipo figuran la exposición a radiación ultravioleta, el voltaje de alta tensión y las temperaturas elevadas.
- Al finalizar, limpiar todas las superficies en las que se han manipulado fluidos biológicos humanos con una solución de hipoclorito de sodio al 10% o su equivalente. Desechar todas las muestras biológicas y los especímenes diluidos en una bolsa de autoclave para sustancias biológicas peligrosas, de conformidad con las directrices relativas a la eliminación de residuos peligrosos.

2.4. Equipo, materiales y soluciones

2.4.1. Equipo

Para analizar la concentración de mercurio total en sangre de cordón umbilical se requiere el siguiente equipo:

- un analizador directo de mercurio (p. ej., Milestone DMA-80).

2.4.2. Materiales

Para analizar la cantidad total de mercurio en la sangre del cordón umbilical se requiere el material siguiente:

- balanza analítica (precisión: 0,1 mg);
- micropipeta de 100 μ L;
- micropipeta ajustable entre 20 y 200 μ L;
- micropipeta ajustable entre 100 y 1000 μ L;
- tubo para alícuotas de muestras de sangre (Cryovial) de 2 ml;
- agitador de vórtice para laboratorio;
- navecillas de cuarzo de 1,5 ml;
- transportador de platillos de muestra;
- guantes sin talco.

2.4.3. Reactivos, sustancias químicas y gases

Para analizar la concentración de mercurio total en sangre de cordón umbilical se requieren los siguientes reactivos, sustancias químicas y gases:

- oxígeno gas (pureza del 99,995%);
- etanol al 70% (pro-análisis);
- ácido clorhídrico al 37% (pro-análisis);
- agua purificada (agua bidestilada).

2.4.4. Soluciones patrón

Solución patrón madre

Se prepara una solución patrón primaria de mercurio (solución madre) con una concentración de 1 mg/ml pesando 0,2500 g de mercurio líquido elemental (Hg^0) en un matraz de vidrio Pyrex de 250 ml. Se añaden 2 ml de ácido nítrico y se diluye con agua bidestilada hasta completar 250 ml. La solución debe conservarse en el refrigerador.

Solución patrón intermedia

Se prepara una solución patrón intermedia de mercurio con una concentración de 5 $\mu g/ml$ en ácido nítrico al 5% mediante una dilución apropiada con agua bidestilada. Los patrones de calibración se preparan preferiblemente en matraces de vidrio; si se conservan en el refrigerador se mantienen estables durante un año. Las soluciones patrón intermedias deben alcanzar la temperatura ambiente antes de preparar la dilución de las soluciones patrón de trabajo.

Soluciones patrón de trabajo

Se preparan soluciones patrón de trabajo de mercurio en dos concentraciones distintas (2 ng/ml y 10 ng/ml), mediante una dilución apropiada en ácido clorhídrico al 5%. Estas soluciones deben conservarse preferiblemente en matraces de vidrio (el Teflón también es adecuado). Las soluciones patrón de trabajo deben conservarse en el refrigerador cuando no se utilicen, y sacarse dos horas antes para que alcancen la temperatura ambiente antes de comenzar a trabajar con ellas. Las soluciones patrón de trabajo se preparan una vez por semana, aunque es recomendable comprobar su estabilidad en las condiciones del laboratorio.

2.4.5 Materiales de referencia

Para la determinación de la concentración de mercurio total en sangre deben utilizarse materiales de referencia certificados. Por ejemplo, para la validación y los controles de calidad periódicos del presente procedimiento operativo estándar se ha empleado Seronorm Trace Elements Whole Blood L-1, con un valor de referencia de 2,2 ng/g (2,0 a 2,4 ng/g). En la tabla 1 se detallan otros materiales de referencia disponibles para medir la concentración de mercurio total en sangre humana.

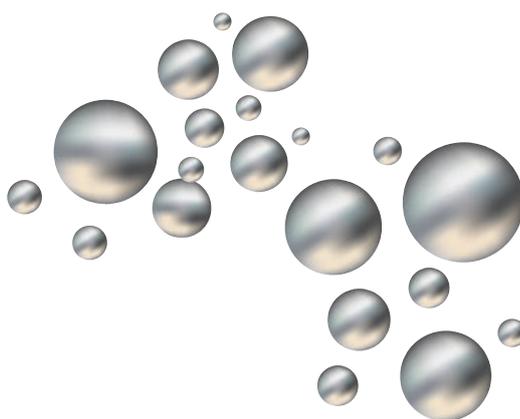


Tabla 1. Materiales de referencia para medir la concentración de mercurio total en sangre humana

Materiales de referencia	Valores de referencia (ng/ml)
SRM 955c Lead in Caprine Blood, de NIST	17,8 ± 1,6
SRM 966 Toxic Metals in Blood, de NIST	31,4 ± 1,7
Seronorm™ Trace Elements Whole Blood L-1, art. 210105	1,97 ± 0,2
Seronorm™ Trace Elements Whole Blood L-2, art. 210205	15,2 ± 1,6
Seronorm™ Trace Elements Whole Blood L-3, art. 210305	31,4 ± 3,4

Nota: continuamente se producen materiales de referencia que reemplazan a los que han quedado obsoletos; por tanto, se recomienda a los usuarios que comprueben periódicamente la disponibilidad comercial de los materiales de referencia apropiados.

2.5. Calibración

Para llevar a cabo la calibración se emplean las soluciones patrón de trabajo, descritas en el apartado 2.4.4.

A fin de abarcar el intervalo de medida apropiado, se introduce con una pipeta un volumen conocido del patrón de calibrado. Por lo general es necesario cubrir un rango de entre 0 y 20 ng (las cantidades más habituales son 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0 y 10,0 ng). El volumen del patrón de calibración no debe ser superior a 0,2 ml. La nueva curva de calibración puede prepararse una vez por semana o incluso menos frecuentemente ya que las calibraciones son muy estables. El programa informático del instrumento permite obtener lecturas automáticas a partir de los gráficos de calibración almacenados en el sistema. No obstante, deben emplearse a diario patrones de calibración de trabajo que abarquen el rango de concentraciones de mercurio presentes en la muestra (por lo general, 0,2, 1,0 y 10,0 ng), a fin de verificar que los gráficos de calibración almacenados en el sistema son correctos.

Al inicio del proceso de medida debe comprobarse que la curva de calibración sea adecuada. Se emplean soluciones patrón de 2 y 10 ng/ml. Si las soluciones patrón de mercurio no se encuentran dentro del intervalo definido, deberá repetirse la curva de calibración.

2.6. Procedimiento

2.6.1. Acondicionamiento del equipo analítico

Datos técnicos

A continuación, se especifican los datos técnicos del equipo analítico:

- principio: espectrometría de absorción atómica;
- sistema de detección de mercurio: espectrofotómetro de haz simple con flujo secuencial a través de dos celdas de medida;
- fuente de luz: lámpara de vapor de mercurio de baja presión;
- longitud de onda: 253,65 nm;
- filtro de interferencias: 254 nm, ancho de banda de 9 nm;
- detector: fotodetector de ultravioleta de silicio;

- intervalos de trabajo:
 - intervalo bajo: 0 a 7,5 ng (límite de absorbancia de la celda 1: 0,45);
 - límite de detección: 0,005 ng;
- muestreador automático: integrado, 40 posiciones;
- gas portador: oxígeno, con entrada de presión 4 bares (60 psi), caudal aproximado de 200 ml/min.

Los datos técnicos que se indican aquí se establecieron durante la configuración del instrumento utilizado en este caso.

Paso 1. Preparación del analizador directo de mercurio

Se deben llevar a cabo las siguientes operaciones de acuerdo al manual del usuario: apertura del suministro de oxígeno, inicio del analizador directo de mercurio y creación de un archivo de datos.

Paso 2. Limpieza del sistema

Antes de efectuar las medidas, es necesario limpiar el sistema. Primero se introduce detergente con una pipeta en dos navecillas de cuarzo y después en la posición vacía. Se debe medir una posición vacía con el programa apropiado. A continuación, se indican los parámetros óptimos, pero se recomienda a los usuarios que comprueben dichos parámetros en su propia configuración:

- tiempo de secado: 0 s (si se usa detergente el tiempo se aumenta a 60 s);
- temperatura de secado: 200 °C;
- tiempo de descomposición: 150 s;
- temperatura de descomposición: 650 °C;
- tiempo de purga: 60 s.

Paso 3. Comprobación del nivel de fondo del sistema

Deben analizarse tres navecillas de combustión de cuarzo vacías mediante el método anterior, con objeto de comprobar que la absorbancia (medida en función de la altura del pico) de las muestras finales es inferior a 0,0030. El laboratorio debe establecer el nivel de fondo aceptable del sistema, de conformidad con las instrucciones del fabricante. Si la absorbancia es superior a 0,0030, deben analizarse más navecillas de combustión de cuarzo hasta obtener el valor definido. Si tras el análisis de cinco navecillas de cuarzo no se obtiene el nivel de fondo deseado, debe limpiarse el sistema mediante el análisis de una solución de detergente en una navecilla de cuarzo siguiendo del procedimiento descrito.

Paso 4. Control de la solución patrón de trabajo

Deben medirse dos réplicas de cada solución patrón (2 ng/ml y 10 ng/ml), que contengan aproximadamente 0,2 ng y 1 ng de mercurio (100 µL de la solución patrón de trabajo), a fin de comprobar la celda 1 (intervalo bajo). La solución patrón de mercurio se mide de la siguiente manera:

- temperatura de secado: 200 °C;
- tiempo de secado: 60 s;
- temperatura de descomposición: 650 °C;
- tiempo de descomposición: 150 s;
- tiempo de purga: 60 s.

El valor de la concentración determinada para la solución patrón de trabajo de mercurio se compara con la establecida por la curva de calibración. Si el valor deseado difiere en más de un 10%, debe repetirse la medida hasta obtener un valor dentro del rango definido. Si no se obtiene dicho valor

tras cinco intentos, será necesario preparar una nueva solución patrón. Si aun así no se obtiene el valor deseado, será necesario recalibrar el sistema, para lo cual se prepararán nuevos patrones de calibración de trabajo.

Paso 5. Control de calidad previo a la medida

A fin de comprobar la celda 1 (intervalo bajo), deben medirse dos muestras de material de referencia certificado (por ejemplo, Seronorm Whole Blood L-1) que contengan aproximadamente 0,2 ng de mercurio (aproximadamente 100 mg de material). El material de referencia se mide de la siguiente manera:

- temperatura de secado: 200 °C;
- tiempo de secado: 120 s;
- temperatura de descomposición: 650 °C;
- tiempo de descomposición: 180 s;
- tiempo de purga: 60 s.

El valor de la concentración determinada para la muestra de material de referencia debe encontrarse en el rango de incertidumbre del valor certificado. En caso contrario, se repetirá la medida hasta obtener un valor dentro de este rango. Si tras cinco intentos no se obtiene dicho valor, será necesario recalibrar el sistema.

Una vez concluidos satisfactoriamente los cinco pasos anteriores, el analizador directo de mercurio estará listo para el análisis de la muestra.

2.6.2. Determinación analítica

Pesada de muestras

Tanto las navecillas de combustión como el soporte utilizado para pesar las muestras de sangre deben ser manipulados con pinzas.

Colocar el soporte de la navecilla de combustión en la balanza. Colocar una navecilla de combustión de cuarzo sobre el soporte y poner a cero la balanza.

Abrir el recipiente que contenga la muestra, trasvasar aproximadamente 200 µL de sangre a la navecilla de combustión y pesar la muestra. Colocar la navecilla con la muestra en la bandeja de muestras y anotar el código de la muestra, el peso y la posición del platillo en el registro de pesaje. Se deben preparar dos réplicas para cada una de las muestras. Entre cada muestra es necesario medir un blanco. Deben utilizarse puntas de pipeta especiales con filtro, que serán repuestas para cada muestra.

Análisis de muestras

Las navecillas de combustión de cuarzo con las muestras y los controles de calidad deben colocarse en el muestreador automático del analizador directo de mercurio en el orden en que se pesaron.

A continuación, se programan las muestras introduciendo su código y peso y seleccionando el método. Los parámetros del método son los siguientes:

- temperatura de secado: 200 °C;
- tiempo de secado: 200 s;
- temperatura de descomposición: 650 °C;
- tiempo de descomposición: 180 s;
- tiempo de purga: 60 s.

Nota. Los parámetros son orientativos y se deben optimizar para cada instrumento de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

A continuación, se proporciona un ejemplo de la secuencia de las muestras:

- detergente;
- detergente;
- blanco (8x);
- solución patrón de trabajo 2 ng/ml;
- solución patrón de trabajo 2 ng/ml;
- blanco;
- solución patrón de trabajo 10 ng/ml;
- solución patrón de trabajo 10 ng/ml;
- blanco;
- material de referencia;
- material de referencia;
- blanco;
- blanco;
- muestra 1;
- muestra 1;
- blanco;
- muestra 2;
- muestra 2;
- blanco;
- solución patrón de trabajo 2 ng/ml;
- solución patrón de trabajo 10 ng/ml;
- blanco;
- muestra 5;
- muestra 5;
- blanco;
- muestra 8;
- muestra 8;
- solución patrón de trabajo 2 ng/ml;
- solución patrón de trabajo 10 ng/ml;
- blanco.

2.6.3. Cálculo de los resultados analíticos

El equipo expresa los datos directamente en nanogramos de mercurio por gramo de sangre mediante la interpolación de la medida en la curva de calibración.

El valor final indicado corresponde a la media de las dos medidas independientes. Si los valores difieren en más del 10%, se debe volver a medir la muestra y se indican los valores medios de dos resultados similares.

2.6.4. Rango de resultados válidos

Los valores de mercurio son válidos cuando los resultados obtenidos se encuentran dentro del rango definido por la curva de calibración. Si la cantidad de mercurio de la muestra se encuentra fuera de dicho rango, se volverá a analizar la muestra como se explica a continuación:

- Si el valor es inferior a la concentración de mercurio más baja incluida en la calibración, debe pesarse la cantidad de sangre necesaria para dos nuevas réplicas con el fin de obtener una nueva determinación dentro del rango de calibración. La cantidad máxima de sangre extraída para el análisis no debe ser superior a 250 mg.
- Si el valor es superior al punto más alto de la calibración, deben pesarse cantidades menores de la muestra a fin de obtener lecturas que se encuentren dentro del rango de calibración.

2.7 Control de calidad

La precisión y exactitud de los análisis de biomarcadores efectuados por los laboratorios deben comprobarse continuamente mediante medidas de aseguramiento de la calidad.

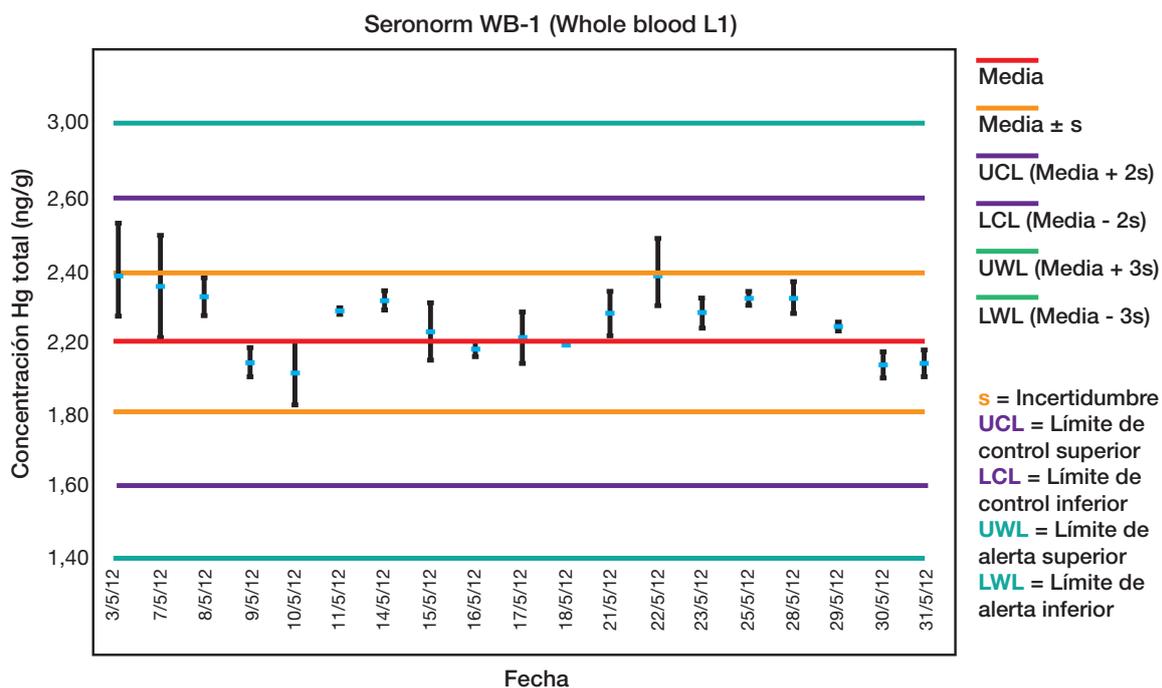
En general, las medidas de aseguramiento de la calidad aplicadas por los laboratorios comprenden controles de calidad internos y externos (véase también la sección *Programa de control de calidad para la vigilancia biológica humana del mercurio*), tal y como se describe a continuación.

- El control de calidad interno es el conjunto de procedimientos empleados por el personal de un laboratorio para evaluar continuamente los resultados a medida que se producen, con objeto de determinar si son suficientemente fiables para comunicarlos.
- El control de calidad externo consiste en comprobar objetivamente el desempeño de un laboratorio mediante el empleo de un sistema externo de control de calidad. Puede llevarse a cabo a través de la participación en comparaciones adecuadas entre laboratorios, si están disponibles.

Para evaluar la exactitud y la precisión del presente procedimiento operativo estándar se utilizan materiales de control de calidad. En la figura 4 se proporciona a modo de ejemplo el gráfico de un control de calidad efectuado con material de referencia para análisis de mercurio en sangre. En el presente procedimiento operativo estándar el material de referencia empleado para el control de calidad fue el Seronorm Whole Blood L-1 ($2,2 \pm 0,2$ ng/ml).

Se recomienda a los laboratorios que controlen cuidadosamente y con regularidad el desempeño del método analítico, conforme a lo descrito en la norma 17 025:2005 de la Organización Internacional de Normalización (ISO) y la Comisión Electrotécnica Internacional (CEI) (17).

Figura 4. Ejemplo de gráfico de control de calidad



T-Hg = concentración de mercurio total.

2.8. Evaluación del método

Cada laboratorio debe cumplir la norma ISO/IEC 17025:2005 “*Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración*” (17). El método debe validarse en lo relativo a sus criterios de desempeño (sensibilidad, linealidad, recuperación, solidez, precisión, exactitud, límite de detección, etc.), y acompañarse de una estimación de la incertidumbre de medida, ya que esta constituye una propiedad fundamental del resultado y un requisito de la norma ISO/IEC 17025:2005. Se recomienda consultar las guías disponibles gratuitamente en EURACHEM (18), en particular las relativas a los protocolos de validación y la evaluación de la incertidumbre. Los niveles de concentración de mercurio en la sangre pueden ser muy bajos; por tanto, para poder medir las concentraciones presentes en la población general, el límite de cuantificación debe ser inferior a 0,1 ng/ml. Se recomienda a quienes utilicen la metodología descrita en el presente procedimiento operativo estándar que sigan el glosario disponible en *Terminology in analytical measurement: Introduction to VIM 3* (19).

A continuación, se especifican los criterios de desempeño aplicados en el presente procedimiento operativo estándar así como el procedimiento empleado para la estimación de la incertidumbre de medida.

2.8.1. Límite de detección y límite de cuantificación

El límite de cuantificación se determinó en función del punto más bajo de la curva de calibración (0,05 ng). Teniendo en cuenta la masa de una de las muestras medidas (0,2 g), el límite de cuantificación se fijó en 0,25 ng/g.

El límite de detección se estableció como el LOQ/3 (0,8 ng/g).

2.8.2. Precisión

Como medida del grado de reproducibilidad del método analítico descrito se emplean análisis periódicos de muestras de sangre de cordón umbilical realizados durante un período de tiempo más prolongado (por ejemplo, un año). Como ejemplo, en la tabla 2 se muestran los resultados de una serie de medidas (n=15) de la concentración de mercurio total en sangre de cordón umbilical. Se analizaron dos réplicas de cada muestra.

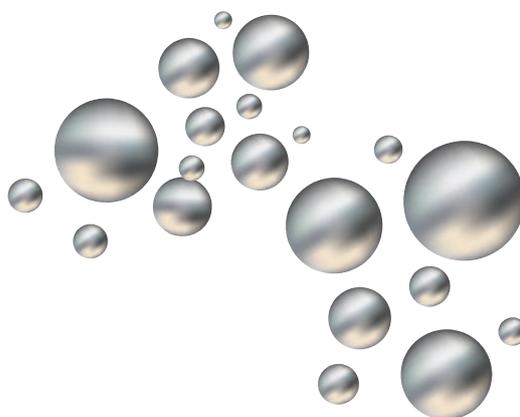


Tabla 2. Resultados de las medidas duplicadas de la concentración de mercurio total en muestras de sangre de cordón umbilical y sus diferencias relativas

Muestra	Resultado D1 (ng/g)	Resultado D2 (ng/g)	Valor medio (D1+D2)/2	Diferencia (D1-D2)	Diferencia relativa (D1-D2)/media
Sangre de cordón umbilical 1	0,87	0,86	0,87	0,01	0,012
Sangre de cordón umbilical 2	3,24	3,25	3,25	-0,01	-0,003
Sangre de cordón umbilical 3	5,45	5,68	5,57	-0,23	-0,041
Sangre de cordón umbilical 4	1,22	1,22	1,22	0,00	0,000
Sangre de cordón umbilical 5	1,28	1,40	1,34	-0,12	-0,090
Sangre de cordón umbilical 6	4,67	4,55	4,61	0,12	0,026
Sangre de cordón umbilical 7	1,34	1,32	1,33	0,02	0,015
Sangre de cordón umbilical 8	2,92	2,92	2,92	0,00	0,000
Sangre de cordón umbilical 9	1,16	1,21	1,19	-0,05	-0,042
Sangre de cordón umbilical 10	1,85	1,58	1,72	0,27	0,157
Sangre de cordón umbilical 11	3,67	3,73	3,70	-0,06	-0,016
Sangre de cordón umbilical 12	1,42	1,36	1,39	0,06	0,043
Sangre de cordón umbilical 13	2,83	2,81	2,82	0,02	0,007
Sangre de cordón umbilical 14	1,94	1,98	2,00	-0,04	-0,020
Sangre de cordón umbilical 15	1,19	1,24	1,22	-0,05	-0,041

D1 = medida 1; D2 = medida 2.

Para evaluar la reproducibilidad o repetibilidad, se calcula la desviación típica de las medidas duplicadas por medio de la siguiente ecuación:

$$RSD_d = \frac{s_d}{\sqrt{n}}$$

RSD_d : desviación típica relativa de las medidas de las réplicas

S_d : desviación típica de las diferencias relativas $((D1-D2)/media)$

n: número de réplicas (n=2)

Se calculó que la repetibilidad del conjunto dado de medidas fue del 3,9%.

2.8.3. Veracidad

La veracidad de los resultados se estimó usando el material de referencia Seronorm WB-1 (Whole blood L1). Como medida de la veracidad, la recuperación (R) se calculó a partir de medidas del material de referencia durante el transcurso de un mes. Los niveles observados se compararon con el valor de referencia aplicando la siguiente ecuación:

$$R = \frac{\text{valor observado}}{\text{valor de referencia}}$$

R: recuperación

En la tabla 3 se muestra un ejemplo de medidas de la concentración de mercurio total en el material de referencia.

Tabla 3. Medidas de la concentración de mercurio total en el Seronorm WB-1 (Sangre total L1)

Medida	Valor medido (ng/g)	Valor verdadero (ng/g)	Recuperación (%)
Día 1	2,39	2,2	109
Día 2	2,35	2,2	107
Día 3	2,32	2,2	105
Día 4	2,14	2,2	97
Día 5	2,11	2,2	96
Día 6	2,28	2,2	104
Día 7	2,31	2,2	105
Día 8	2,23	2,2	101
Día 9	2,17	2,2	99
Día 10	2,21	2,2	100
Día 11	2,19	2,2	99
Día 12	2,27	2,2	103
Día 13	2,39	2,2	109
Día 14	2,28	2,2	104
Día 15	2,32	2,2	105
Día 16	2,32	2,2	105
Día 17	2,24	2,2	102
Día 18	2,13	2,2	97
Día 19	2,14	2,2	97

A partir de las medidas proporcionadas en la tabla 3, se calculó una recuperación del 102%.

2.8.4. Incertidumbre de medida

La incertidumbre en la medida de la concentración de mercurio total en sangre de cordón umbilical por desorción térmica y espectrometría de absorción atómica de vapor frío se estimó de conformidad con la ISO 21748:2010 "Orientaciones para el uso de estimaciones de la repetibilidad, la reproducibilidad y la veracidad en la estimación de la incertidumbre de medida". A tal fin, se emplearon los datos sobre la reproducibilidad (repetibilidad) y la recuperación procedentes del estudio de validación.

La incertidumbre de la repetibilidad (u_{rep}) fue del 3,9% (sección 2.8.2), en tanto que la incertidumbre de la recuperación ($u(R_m)$ o u_{rec}), del 1,7%, se calculó de la siguiente manera:

$$u(\bar{R}_m) = \bar{R}_m \times \sqrt{\frac{s_{obs}^2}{n \cdot \bar{C}_{obs}^2} + \frac{u(C_{ref})}{C_{ref}}^2}$$

R_m : recuperación

s_{obs} : desviación típica de los datos observados

C_{obs} : valor medio de los datos observados

C_{ref} : valor de referencia

$u(C_{ref})$: incertidumbre del valor de referencia

Finalmente, en el paso 4, se calculó la incertidumbre combinada. Antes de combinarlas, es necesario expresar todas las contribuciones a la incertidumbre como incertidumbres típicas (desviaciones típicas). La incertidumbre combinada (u_c) se calculó como:

$$u_c = \sqrt{u_{rep}^2 + u_{rec}^2}$$

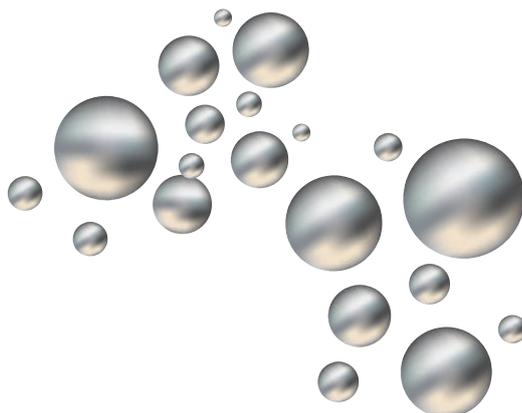
u_c : incertidumbre combinada

u_{rep} : error debido a la reproducibilidad

u_{rec} : error debido a la recuperación

La incertidumbre expandida (U) se calculó multiplicando u_c por el factor k . La elección del factor k depende del nivel de confianza deseado. El valor de k necesario para un nivel de confianza de aproximadamente el 95% es 2.

La incertidumbre de medida estimada en la determinación de la concentración de mercurio total en sangre de cordón umbilical por descomposición térmica y espectrometría de absorción atómica de vapor frío es del 4,3%, y la incertidumbre expandida ($k=2$), del 8,4%. Este cálculo es válido para un intervalo "normal" de exposición, es decir, por debajo de 5,8 ng/g.



3. Interpretación de los resultados

Los niveles de mercurio en la sangre reflejan la exposición debida al consumo de pescado o agua potable contaminados, la inhalación de vapor de mercurio elemental en el aire ambiente y la exposición a través de amalgamas dentales y tratamientos médicos. La presencia de mercurio en la sangre indica una exposición reciente al mercurio. Existe una relación directa entre las concentraciones de mercurio en la sangre humana y el consumo de pescado contaminado con metilmercurio. Por lo general, la concentración de metilmercurio en la sangre alcanza su máximo tras un lapso de entre 4 y 14 horas, y desaparece de la sangre al pasar a otros tejidos corporales entre 20 y 30 horas después (6).

En la etapa inicial del análisis de los datos (estadística descriptiva) deben calcularse los valores estadísticos básicos correspondientes a cada biomarcador: los valores mínimos y máximos, el porcentaje de sujetos que presentan valores del biomarcador por encima del límite de cuantificación o del límite de detección y la media geométrica. También pueden calcularse los valores del percentil, es decir, los valores de una variable por debajo de los cuales se sitúa un cierto porcentaje de las observaciones: el percentil 50 (P50, correspondiente a la mediana), el percentil 90 (P90) y el percentil 95 (P95). Pueden indicarse, además, los porcentajes de resultados que exceden los valores de referencia o los valores pertinentes para la protección de la salud (20).

Los datos resultantes de la vigilancia biológica humana pueden interpretarse a través de la comparación de los niveles observados con los valores de referencia pertinentes para la protección de la salud determinados por la vigilancia biológica. En este contexto, la Comisión Alemana de Vigilancia Biológica Humana ha establecido valores de referencia para varios compuestos (21). Para determinar estos valores se ha basado ya sea en las relaciones entre la exposición y el efecto (por ejemplo, en el caso del cadmio, el plomo, el mercurio y el pentaclorofenol) o en la ingesta diaria tolerable (20).

De acuerdo a los resultados observados en la mayoría de los estudios nacionales europeos, las medias geométricas de la concentración de mercurio en sangre se encuentran en torno a 1 µg/L o por debajo. No obstante, en algunas subpoblaciones los niveles exceden el límite de 5 µg/L, a partir del cual se consideran perjudiciales para la salud (20).

La OMS considera que la concentración media normal de mercurio en la sangre de las personas que no consumen pescado contaminado es 5 - 10 µg/L (6). El Comité Nacional de Investigación de los Estados Unidos fija en 2 µg/L la concentración media normal en las poblaciones del país cuyo consumo de pescado es escaso o nulo (22).

A través de la vigilancia biológica, estima la exposición correspondiente a 5 - 6 µg/L de mercurio en sangre de cordón umbilical y a 4 - 5 µg/L en la sangre. Por lo general, esta relación es directamente proporcional.

La tabla 4 proporciona un ejemplo de la concentración de mercurio en la sangre de la población de diferentes provincias del Canadá, obtenido de los resultados de un estudio del Programa de Vigilancia y Evaluación del Ártico (AMAP) (2003) (23).

Se prevé que la relación media entre la ingesta (µg/kg día) y los niveles en la sangre (µg/L) en la población a lo largo del tiempo por lo general será coherentes. La relación cuantitativa entre los niveles de mercurio en la sangre y los niveles de mercurio (en especial de metilmercurio) de la dosis (o ingesta) diaria media es bastante conocida.

Tabla 4. Resumen de los datos de Canadá sobre los niveles de mercurio y metilmercurio en sangre materna

País/grupo étnico/región	Número de participantes	Media de la concentración de mercurio total (µg/L)	Intervalo de la concentración de mercurio total (µg/L)	Media de la concentración de metilmercurio (µg/L)	Intervalo de la cantidad de metilmercurio (µg/L)
Canadá	134	0,9	nd-4,2	0,69	nd-3,6
Caucásico 1 (1994-1999)					
Metis/Dene (1994-1995)	92	1,4	nd-6,0	0,8	nd-4,0
Otros (1995)	13	1,3	0,2-3,4	1,2	nd-3,0
Baffin 1 (1996)	31	6,7	nd-34	6,0	nd-29
Inuvik 1 (1998-1999)	31	2,1	0,6-24	1,8	nd-21
Kitikmeot 1 (1994-1995)	63	3,4	nd-13	2,9	nd-11
Kivalliq 1 (1996-1997)	17	3,7	0,6-12	2,7	0,4-9,7
Nunavik 2 (1995-2000)	162	9,8	1,6-44	no disp.	no disp.

n. d. = no detectado; no disp. = no disponible.

Fuente: AMAP 2003 (23).

Por tanto, si se cuenta con información suficiente sobre las diferentes especies químicas de mercurio y otros factores, es posible calcular con razonable certeza las dosis a partir de los niveles de mercurio. No obstante, a la hora de efectuar dicha conversión es necesario tener en cuenta la variabilidad de la población (24). Por ejemplo, se estima que, en el caso de una mujer adulta, una ingesta diaria media de metilmercurio de 0,1 µg por kilogramo de peso corporal t (0,1 µg/kg al día) dará como resultado un nivel de mercurio en la sangre del cordón umbilical de entre 5 y 6 t µg/L (24).



Referencias

1. El mercurio y la salud [hoja informativa en línea]. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 2013. Disponible en <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/mercury-and-health> (consultado el 17 de enero de 2018).
2. Holmes P., James K. A., Levy L. S. "Is low-level environmental mercury exposure of concern to human health?" *Science of the Total Environment*. 2009, n.º 408, págs. 171 a 182. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969709009061?via%3Dihub> (consultado el 31 de enero de 2018).
3. Hong Y. S., Kim Y. M., Lee K. E. "Methylmercury exposure and health effects". *Journal of Preventive Medicine and Public Health*. 2012, vol. 45, n.º 6, págs. 353 a 363. Disponible en <https://www.jpmp.org/journal/view.php?doi=10.3961/jmpm.2012.45.6.353> (consultado el 31 de enero de 2018).
4. Woods J. S., Martin M. D., Leroux B. G., DeRouen T. A., Leitao J. G., Bernardo M. F. *et al.* "The contribution of dental amalgam to urinary mercury excretion in children". *Environmental Health Perspectives*. 2007, n.º 115, págs. 1527 a 1531. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2022658/> (consultado el 31 de enero de 2018).
5. Zeitz P., Orr M. F., Kaye W. E. "Public health consequences of mercury spills: hazardous substances emergency events surveillance system, 1993-1998". *Environmental Health Perspectives*. 2002, n.º 110, págs. 129 a 133. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1240725/pdf/ehp0110000129-31.pdf> (consultado el 31 de enero de 2018).
6. *Methylmercury. Environmental Health Criteria 101*. Ginebra: Organización Mundial de la Salud y Programa Internacional sobre Seguridad en la Química, 1990. Disponible en http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/38082/1/9241571012_eng.pdf (consultado el 31 de enero de 2018).
7. Guidance for identifying populations at risk from mercury exposure. Ginebra: Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente y Organización Mundial de la Salud, 2008. Disponible en <https://www.who.int/foodsafety/publications/chem/mercuryexposure.pdf?ua=1> (consultado el 31 de enero de 2018).
8. Mason H. J., Hindell P., Williams N. R. "Biological monitoring and exposure to mercury". *Occupational Medicine*, 2001, n.º 51, págs. 2 a 11. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/12095723_Biological_monitoring_and_exposure_to_mercury (consultado el 31 de enero de 2018).
9. Barregård L. "Biological monitoring of exposure to mercury vapour". *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*. 1993, vol.19, n.º 1, págs. 45 a 49. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/45> (consultado el 31 de enero de 2018).
10. Miklavčič A., Cuderman P., Mazej D., Snoj Tratnik J., Krsnik M., Planinšek P. *et al.* "Biomarkers of low-level mercury exposure through fish consumption in pregnant and lactating Slovenian women". *Environmental Research*. 2011, n.º 111, págs. 1201 a 1207. Disponible en http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/41/131/41131311.pdf (consultado el 31 de enero de 2018).
11. Gradjean P., Jørgensen P. J., Weihe P. "Validity of mercury exposure biomarkers". En: Wilson S. H., Suk W. A., editores. *Biomarkers of environmentally associated disease*. Boca Ratón: CRC Press, 2002, págs. 235 a 247.
12. Smolders R., Schramm K.-W., Nickmilder M., Schoeters G. "Applicability of non-invasively collected matrices for human biomonitoring". *Environmental Health*. 2009, n.º 8, p. 8. Disponible en <https://ehjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-069X-8-8> (consultado el 31 de enero de 2018).

13. Gradjean P., Budtz-Jørgensen E., Jørgensen P. J., Weihe P. "Umbilical cord mercury concentration as a biomarker of prenatal exposure to methylmercury". *Environmental Health Perspectives*. 2005, n.º 113, págs. 905 a 908. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1257654/> (consultado en 31 de enero de 2018).
14. Miklavčič A., Casetta A., Snoj Tratnik J., Mazej D., Krsnik M., Mariuz M. *et al.* "Mercury, arsenic and selenium exposure levels in relation to fish consumption in the Mediterranean area". *Environmental Research*. 2013, n.º 120, págs. 7 a 17. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001393511200268X?via%3Dihub> (consultado el 31 de enero de 2018).
15. Akagi H. "Analytical methods for evaluating human exposure to mercury due to gold mining". En: *Proceedings of the International Workshop on Health and Environmental Effects of Mercury due to Mining Operations*, Manila, 26 a 27 de noviembre de 1997. Minamata: Instituto Nacional para la Enfermedad de Minamata, 1998, págs. 131 a 141.
16. DMA 80. En: Milestone [sitio web]. Sorisole: Milestone, 2018. Disponible en <https://www.milestonesrl.com/en/mercury/dma-80/> (consultado el 31 de enero de 2018).
17. ISO/IEC 17025:2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Ginebra: Organización Internacional de Normalización, 2005. Disponible en <https://www.iso.org/standard/39883.html> (consultado el 31 de enero de 2018).
18. Eurachem [sitio web]. Olomouc: Eurachem, 2018. Disponible en <http://www.eurachem.org> (consultado el 31 de enero de 2018).
19. Barwick V. J., Prichard E., editores. *Eurachem Guide: Terminology in analytical measurement – Introduction to VIM 3*. Eurachem, 2011. Disponible en https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/TAM_2011_Final_web.pdf (consultado el 12 de diciembre de 2017).
20. *Human biomonitoring: facts and figures*. Copenhague, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud para Europa, 2015. Disponible en <http://www.euro.who.int/en/media-centre/events/events/2015/04/ehp-mid-term-review/publications/human-biomonitoring-facts-and-figures> (consultado el 5 de diciembre de 2017).
21. Schulz C., Conrad A., Becker K., Kolossa-Gehring M., Seiwert M., Seifert B. "Twenty years of the German Environmental Survey (GerES): Human biomonitoring – temporal and spatial (West Germany/East Germany) differences in population exposure". *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2007, vol. 210, n.º 3 y 4, págs. 271 a 297. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438463907000454?via%3Dihub> (consultado el 31 de enero de 2018).
22. Consejo Nacional de Investigaciones. *Toxicological effects of methylmercury*. Washington D. C.: National Academy Press, 2000. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK225778/> (consultado el 31 de enero de 2018).
23. *AMAP Assessment 2002: Human health in the Arctic*. Oslo: Arctic Monitoring and Assessment Programme, 2003. Disponible en <https://www.amap.no/documents/doc/amap-assessment2002-human-health-in-the-arctic/95> (consultado el 31 de enero de 2018).
24. Stern A. H. "A revised probabilistic estimate of the maternal methyl mercury intake dose corresponding to a measured cord blood mercury concentration". *Environmental Health Perspectives*. 2005, vol. 113, n.º 2, págs. 155 a 163. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1277858/> (consultado el 31 de enero de 2018).

Anexo 1. Cuestionario para la toma de muestras de sangre de cordón umbilical

Nombre de la madre	
Número de historial médico	
ID del estudio de la madre	
Trabajador médico	Firma Nombre
1. Fecha y hora de toma de la muestra	-----/-----/-----/ (día/mes/año) Inicio: -----/----- (hora/min)
2. ¿Cuándo comió por última vez antes de la toma de la muestra?	-- horas
3. Volumen (aproximado) de sangre tomada	-- _ ml

Anexo 2. Registro de recepción de muestras de sangre de cordón umbilical

A rellenar por la matrona

Nombre del hospital: _____

Nombre de la matrona que toma las muestras: _____

Nombre del paciente	ID de la muestra	Información sobre el nacimiento	Toma de sangre de cordón umbilical	Información de la muestra Tubo 1	Información de la muestra Tubo 2
		Fecha: _____ Hora: _____	Hora de inicio de la toma Hora de finalización de la toma	Tubo B1 con AEDT: volumen= _____ml (min 10 ml) conservado a -20 °C	Tubo B2: volumen= _____ml (min 2 ml) conservado a -20 °C
		Fecha: _____ Hora: _____	Hora de inicio de la toma Hora de finalización de la toma	Tubo B1 con AEDT: volumen= _____ml (min 10 ml) conservado a -20 °C	Tubo B2: volumen= _____ml (min 2 ml) conservado a -20 °C
		Fecha: _____ Hora: _____	Hora de inicio de la toma Hora de finalización de la toma	Tubo B1 con AEDT: volumen= _____ml (min 10 ml) conservado a -20 °C	Tubo B2: volumen= _____ml (min 2 ml) conservado a -20 °C

AEDT = ácido etilendiaminotetraacético

Procedimiento operativo estándar para la determinación de mercurio en orina

(toma de muestras, análisis de la concentración de mercurio total e interpretación de los resultados)

Resumen

En el presente procedimiento operativo estándar se describe el proceso de evaluación de la exposición al mercurio a través de la vigilancia biológica humana mediante el uso de la orina como matriz biológica. En el presente documento se describe el proceso de toma de muestras de orina, análisis de la concentración de mercurio total e interpretación de los resultados.

Palabras clave

Mercurio: análisis

Mercurio: orina

Compuestos de metilmercurio: análisis

Orina: química

Biomarcadores: análisis

Exposición materna

Intercambio maternofetal

Bebé, recién nacido

Exposición ambiental

Colaboradores

Milena Horvat

Instituto Jožef Stefan, Ljubljana (Eslovenia)

Greet Schoeters

VITO, Boeretang, Bélgica

Marta Esteban López

Centro Nacional de Sanidad Ambiental del Instituto de Salud Carlos III (España)

Argelia Castaño Calvo

Centro Nacional de Sanidad Ambiental del Instituto de Salud Carlos III (España)

Vesna Fajon

Instituto Jožef Stefan, Ljubljana (Eslovenia)

Índice

Abreviaturas.....	102
Introducción: la orina como matriz para la vigilancia biológica humana del mercurio.....	103
1. Muestreo de orina.....	104
1.1. Alcance del método.....	104
1.2. Medidas de seguridad.....	104
1.3. Materiales requeridos.....	104
1.4. Preparación o tratamiento previo del material de muestreo.....	106
1.5. Procedimiento de muestreo.....	108
1.6. Etiquetado.....	108
1.7. Transporte y conservación de las muestras.....	109
1.8. Recepción de muestras.....	109
1.9. Preparación de alícuotas de las muestras.....	110
1.10. Almacenamiento y conservación.....	111
1.11. Control de calidad.....	111
2. Análisis de la cantidad total de mercurio presente en la orina.....	112
2.1. Alcance del método.....	112
2.2. Principio técnico.....	112
2.3. Medidas de seguridad.....	112
2.4. Equipo, materiales y soluciones.....	113
2.5. Calibración.....	115
2.6. Procedimiento.....	115
2.7. Cálculo de los resultados analíticos.....	116
2.8. Control de calidad.....	117
2.9. Evaluación del método.....	117
3. Análisis del contenido de creatinina en la orina.....	122
3.1. Alcance del método.....	122
3.2. Principio técnico.....	122
3.3. Medidas de seguridad.....	123
3.4. Equipo, materiales y soluciones.....	123
3.5. Tratamiento y preparación de la muestra.....	125
3.6. Procedimiento.....	126
3.7. Control de calidad.....	126
3.8. Evaluación del método.....	128
3.9. Fuentes de error.....	129
3.10. Método alternativo: determinación de la gravedad específica de las muestras de orina.....	130
4. Interpretación de los resultados.....	131
Referencias.....	132
Anexo 1. Instrucciones de toma de orina para los participantes.....	135
Anexo 2. Cuestionario para la toma de muestras de orina.....	136
Anexo 3. Listado de recepción de muestras.....	137

Abreviaturas

CVAAS	espectrometría de absorción atómica de vapor frío
VBH	vigilancia biológica humana
Hg	mercurio
ID	identificación
LDD	límite de detección
LDC	límite de cuantificación
SG	gravedad específica
POE	procedimiento operativo estándar

Introducción: la orina como matriz para la vigilancia biológica humana del mercurio

El mercurio (Hg) es un elemento que se presenta de forma natural en el ambiente y se distribuye en él a través de procesos naturales y antropogénicos. Es persistente en el medio ambiente y se encuentra en varias formas químicas, en concreto como mercurio elemental, mercurio inorgánico (Hg^{2+} compuestos) y mercurio orgánico (principalmente metilmercurio, MeHg) (1).

La toxicidad del mercurio afecta principalmente al sistema nervioso, los riñones y el sistema cardiovascular. Los efectos sobre el sistema nervioso constituyen el criterio de valoración toxicológico más sensible tras la exposición a mercurio elemental y a metilmercurio, mientras que en el caso de la exposición a compuestos de mercurio inorgánico son las afecciones renales (1, 2).

La exposición a mercurio elemental o inorgánico se produce por los derrames de mercurio, las amalgamas dentales, la inhalación en espacios cerrados debido a la ruptura de termómetros o bombillas que contienen mercurio, el uso de algunas cremas y jabones blanqueadores de la piel, su utilización en medicina tradicional y determinadas prácticas culturales y en exposición ocupacional (3 a 5).

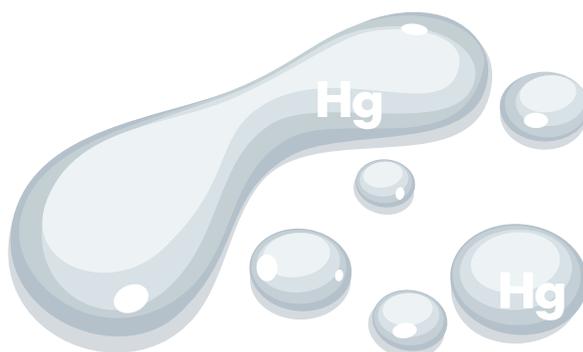
El grado de exposición al mercurio puede valorarse mediante los niveles de este metal en varias matrices humanas, como por ejemplo el cabello, la sangre o la orina, siendo todas ellas valiosas herramientas de evaluación (3, 6 a 8).

Por lo general se considera que los niveles de mercurio en la orina constituyen la mejor medida de la exposición reciente a mercurio inorgánico o a vapor de mercurio elemental, ya que se considera que es el mejor indicador de los niveles de mercurio presentes en los riñones (3).

La orina es una matriz fácil de recoger y, en comparación con otras matrices biológicas, está disponible en mayores cantidades. Generalmente se emplean muestras de orina recogidas de forma puntual, en lugar de durante 24 horas, ya que estas últimas resultan más incómodas y es más probable que las muestras se contaminen por abrir continuamente el recipiente.

La desventaja de las muestras puntuales es la variabilidad del volumen de orina producido y que la concentración de sustancias químicas endógenas y exógenas puede diferir considerablemente de una micción a otra, en función del estado de hidratación, el tiempo transcurrido desde la última micción, etc. En consecuencia, para este tipo de muestras debe realizarse un ajuste de la dilución. Para ajustar la concentración del biomarcador en la orina pueden utilizarse varios métodos, como por ejemplo la corrección por creatinina o por gravedad específica (9 a 11).

Si bien las muestras puntuales pueden recogerse a cualquier hora, se recomienda recoger la primera orina de la mañana, ya que de lo contrario es posible que el biomarcador analizado se encuentre por debajo del límite de cuantificación debido a la dilución de la muestra. Otra posibilidad es tomar las muestras después de al menos cinco horas desde la última micción.



1. Toma de muestras de orina

1.1. Alcance del método

El método para tomar muestras de orina que se describe en el presente procedimiento operativo estándar permite analizar concentraciones de mercurio y abarca todas las fases pre-analíticas de la vigilancia biológica humana del mercurio mediante la orina. El procedimiento de toma de muestras aquí descrito permite a los trabajadores de campo recoger y manipular apropiadamente las muestras biológicas antes de que se analicen en el laboratorio.

1.2. Medidas de seguridad

Las muestras de orina serán tomadas por las mujeres participantes. No obstante, al trabajar con orina (preparación de alícuotas u otras manipulaciones) deben tomarse las medidas de seguridad generales para trabajar con materiales biológicos.

- Al manipular fluidos o tejidos corporales humanos, usar guantes, bata de laboratorio y gafas de seguridad.
- Colocar todos los objetos desechables de plástico, vidrio y papel (por ejemplo, las puntas de pipeta, los tubos del muestreador automático y los guantes) que entrarán en contacto con fluidos biológicos humanos, como la orina, en una bolsa de autoclave para sustancias biológicas peligrosas.
- Mantener estas bolsas en contenedores apropiados hasta que se sellen y se esterilicen en el autoclave.

1.3. Material necesario

En la tabla 1 se incluyen los materiales necesarios para el muestreo y el pretratamiento del material de muestreo.

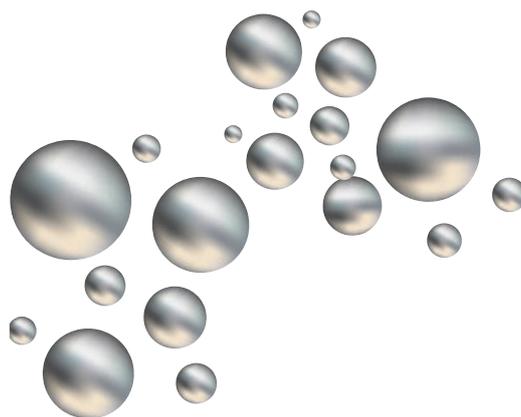


Tabla 1. Material necesario para la toma de muestras de orina

Material	Justificación	Alternativa
Ácido nítrico extrapuro al 65%	Se utiliza para limpiar los recipientes a fin de eliminar la contaminación de fondo por metales.	
Agua purificada	Se utiliza en el proceso de limpieza.	Agua bidestilada
Contenedores	3 tanques diferentes para el proceso de limpieza (1 para la solución ácida y 2 para el agua).	
Recipientes para la orina (véase más adelante)	Recipientes con tapa. El volumen del recipiente depende de la cantidad de orina requerida en el análisis y su conservación en biobancos (si está previsto).	
Guantes resistentes a los ácidos	Como medida de seguridad.	
Etiquetas	Las muestras se deben ser identificadas de forma inequívoca.	Escribir el código de ID directamente en el recipiente con un rotulador de tinta indeleble.
Rotulador de tinta indeleble	No es esencial, pero resulta muy útil para marcar la cantidad mínima de orina que debe recogerse.	Cualquier otro material para escribir que permita asegurar que la marca permanece claramente legible.
Papel de filtro	Se utiliza durante el lavado de los recipientes.	
Bolsas de plástico con cierre hermético	Se utilizan para aislar más el recipiente.	Cualquier otro tipo de bolsa
Embalaje isotérmico	Las muestras de orina deben conservarse a 4 °C hasta su llegada al laboratorio.	
Etiquetas resistentes a la congelación, para la identificación de las muestras	Se utilizan para etiquetar las muestras.	
Ácido sulfámico 2 M	Para prevenir la pérdida de mercurio en la muestra antes del análisis.	

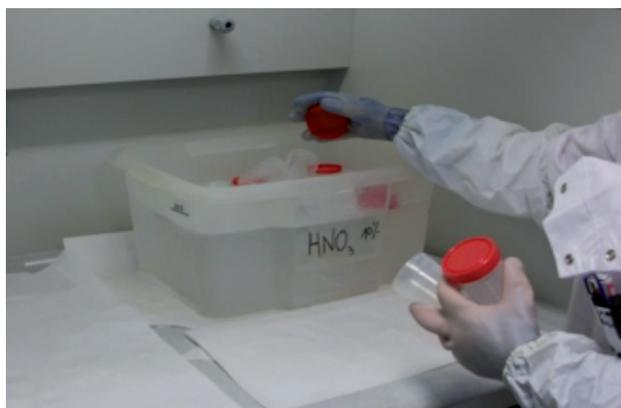
ID = identificación.

Para el análisis de mercurio, antes de la toma de muestras de orina, debe añadirse ácido sulfámico 2 M en una proporción de 10 µL de solución conservante por 1 ml de orina (por ejemplo, en el caso de un tubo que contenga 50 µL de conservante, pueden añadirse hasta 5 ml de orina).

1.4. Preparación o tratamiento previo del material para la toma de muestras

Los recipientes empleados para la recogida de orina deben limpiarse previamente para eliminar la contaminación de fondo por metales. Todos los recipientes y sus tapas deben lavarse con una solución de ácido nítrico, de acuerdo al siguiente procedimiento. Obsérvese que el lavado previo de los recipientes debe llevarse a cabo en una campana de gases químicos de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio, según las directrices de seguridad del laboratorio y usando un equipo protector.

1. Etiquete los diferentes recipientes indicando la solución que contiene: 10% de ácido nítrico; tanque de enjuague 1; tanque de enjuague 2.
2. Colóquelos en la campana de gases químicos
3. Prepare la solución ácida diluida con ácido nítrico extrapuro al 65% y agua purificada. (Nota: para limpiar 240 recipientes de 100 ml se requieren aproximadamente 18 l de solución ácida (2,8 l de ácido nítrico al 65% y 15,2 l de agua bidestilada. La solución ácida puede usarse hasta un mes después de su preparación).
4. Llene los tanques con la solución correspondiente.
5. Abra los recipientes e introdúzcalos, junto con sus tapas, en el tanque que contiene la solución ácida (déjelos toda la noche o al menos tres horas). Compruebe que los recipientes y las tapas están completamente sumergidos (fotografía 1).



Fotografía 1. Los recipientes y las tapas se introducen en la solución ácida.

© Instituto de Salud Carlos III

6. Extraiga los recipientes del tanque que contiene la solución ácida y colóquelos en el primer tanque de agua purificada, agitándolos durante 2 o 3 minutos. A continuación, traspase los recipientes y las tapas al segundo tanque y vuelva a agitarlos 2 o 3 minutos (fotografía 2).



Fotografía 2. Los recipientes se enjuagan en tanques de agua purificada.

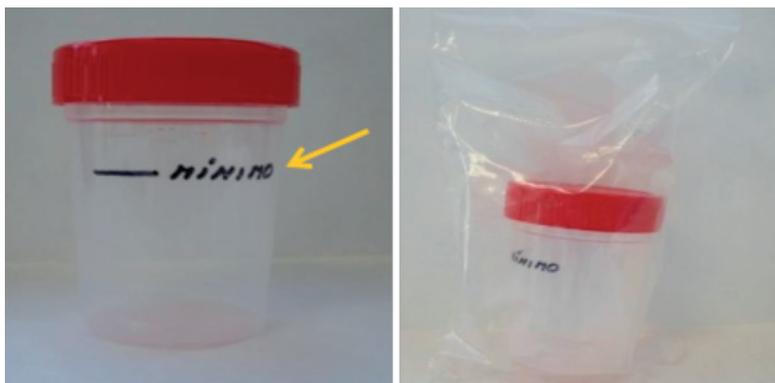
© Instituto de Salud Carlos III

7. Retire los recipientes y las tapas del segundo tanque de agua y colóquelos boca abajo sobre una hoja limpia de papel de filtro dentro de la campana de gases químicos para que se sequen (fotografía 3).



Fotografía 3. Los recipientes y las tapas se secan en la campana de gases.
© Instituto de Salud Carlos III

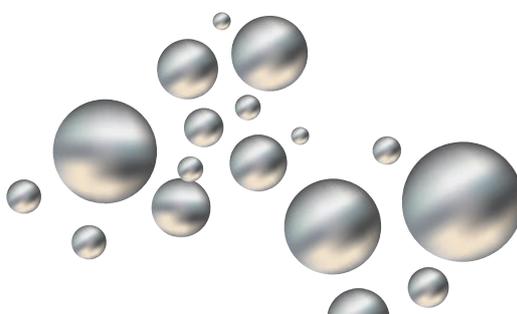
8. Tape los recipientes e indique con una marca el volumen mínimo requerido (nota: este paso es opcional, pero resulta muy útil para evitar que el volumen de las muestras tomadas sea insuficiente). Introduzca cada recipiente lavado en una bolsa de plástico con cierre hermético (fotografías 4a y b).



Fotografías 4a y b. Se marca el volumen mínimo necesario (a) y se colocan los recipientes en una bolsa de plástico con cierre hermético.
© Instituto de Salud Carlos III

Tras el proceso de lavado, debe comprobarse si existe contaminación de fondo. Para ello, se seleccionan al azar el 5% de los recipientes lavados y se llenan con agua purificada. Se agitan durante 10 minutos y a continuación se coge una alícuota de cada recipiente para determinar la concentración de mercurio.

Finalmente, si los recipientes provienen de distintos lotes, debe registrarse a qué lote corresponden los recipientes enviados a cada uno de los centros en los que se toman muestras.



1.5. Procedimiento de toma de muestras

Idealmente, los trabajadores de campo deben entregar los recipientes de orina a las voluntarias con antelación, para que estas puedan tomar la primera orina de la mañana. (Otra opción es tomar las muestras de orina de la madre durante el proceso de admisión en la unidad de maternidad, antes del nacimiento del niño). Cada recipiente debe ir acompañado de instrucciones detalladas por escrito sobre cómo tomar la muestra de orina (véase un ejemplo en el anexo 1). Además de estas instrucciones, los trabajadores de campo deben explicar personalmente a las voluntarias cómo tomar la muestra y aclarar sus dudas. Los cuestionarios que acompañan a las muestras (anexo 2) deben administrarse en el momento de la entrega de la muestra.

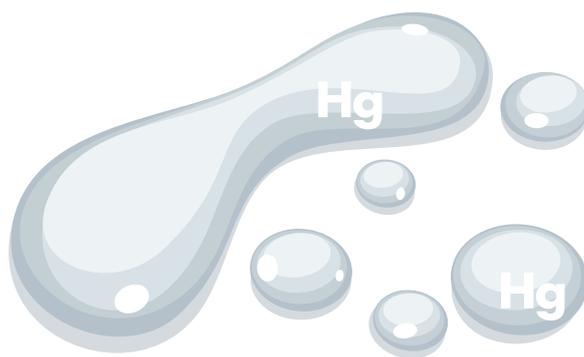
Las muestras de orina deben conservarse a 4 °C hasta su llegada al laboratorio. Como alternativa, pueden prepararse las alícuotas en la unidad de maternidad y congelarse a -20 °C. En este caso, las muestras deben mantenerse congeladas durante su transporte al laboratorio.

Nota. Deben usarse con regularidad blancos de control (al menos un blanco en cada unidad de maternidad). Los recipientes destinados a los blancos deben abrirse en la unidad de maternidad y manipularse exactamente igual que los de las muestras reales pero sin tomar la muestra. Esto permite evaluar la posible contaminación de la muestra en el lugar del muestreo.

1.6. Etiquetado

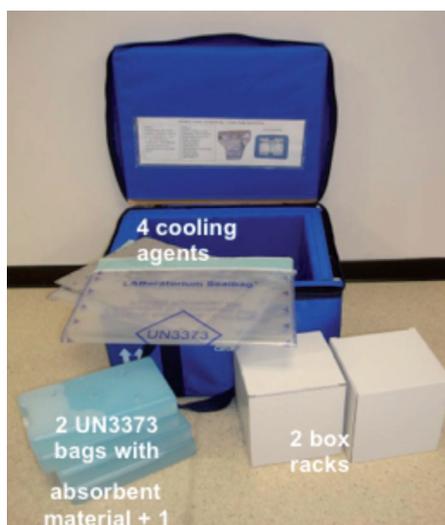
Los recipientes de las muestras de orina pueden etiquetarse de dos maneras.

- Con antelación, después del procedimiento de lavado: se pega una etiqueta que incluya el código de identificación (ID) y un espacio para apuntar la fecha de toma de la muestra.
- Después de la toma de la muestra: inmediatamente después de que la voluntaria entregue la muestra al trabajador de campo, se etiqueta el recipiente con el código de ID y la fecha de muestreo.



1.7. Transporte y conservación de las muestras

Las muestras de orina deben conservarse a 4°C hasta su llegada al laboratorio, donde se prepararán alícuotas y se analizarán o se almacenarán hasta su análisis. (Otra posibilidad es realizar y congelar las alícuotas en la unidad de maternidad). Además, las muestras de orina deben transportarse de acuerdo a la normativa para el transporte de materiales biológicos. La fotografía 5 muestra un embalaje isotérmico apropiado para el transporte de muestras.



Fotografía 5. Ejemplo de embalaje isotérmico.
© Instituto de Salud Carlos III

1.8. Recepción de muestras

Durante la recepción de muestras de orina deben comprobarse los siguientes puntos.

- Las condiciones en que se transportaron y almacenaron las muestras (no deben aceptarse muestras transportadas y almacenadas a altas temperaturas).
- El uso de conservantes durante la toma de muestras (para la toma de muestras de orina destinadas al análisis de mercurio deben utilizarse recipientes con ácido sulfámico 2 M).
- El embalaje debe estar cerrado correctamente y no presentar signos de manipulación (nota: se puede colocar un sello de seguridad en el embalaje en el lugar de toma de muestras).
- El embalaje debe contener todas las muestras enumeradas en el registro de muestras tomadas.
- Todas las muestras deben ir acompañadas de los documentos correspondientes (cuestionarios, etc.).
- Todas las muestras y documentos recibidos deben estar adecuadamente identificados con el correspondiente código de ID.
- Las muestras recogidas deben tener volumen suficiente.
- El contenedor de transporte no debe estar contaminado.

El anexo 3 contiene un registro de recepción de muestras de orina. Los elementos mencionados en dicho documento pueden variar en función de los requisitos necesarios para la conservación de muestras o la estabilidad o conservación de los analitos.

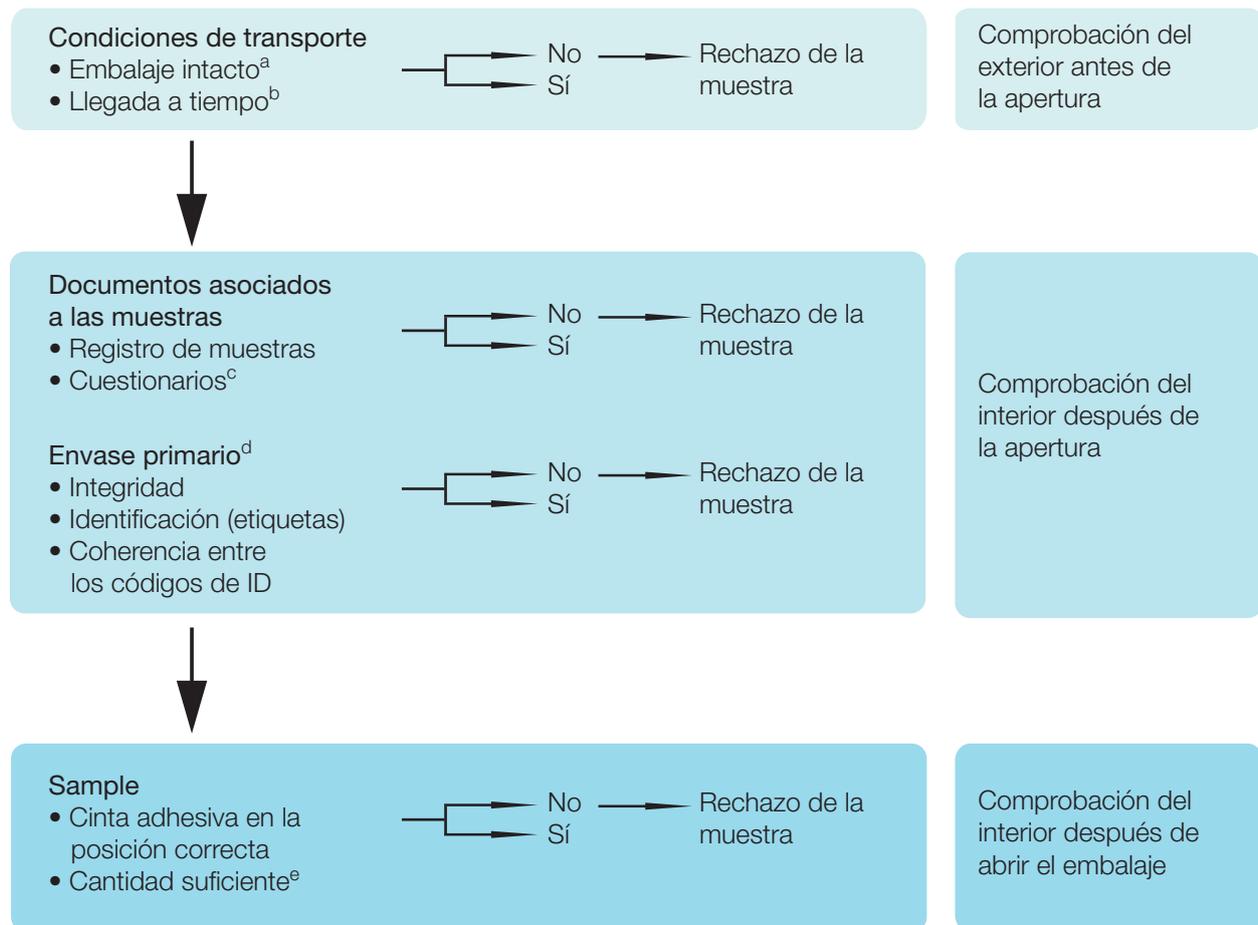
Nota. Si se han empleado blancos de campo (por ejemplo, recipientes con agua purificada), deben comprobarse y registrarse de la misma manera que el resto de muestras.

1.8.1. Criterios de aceptación o rechazo de las muestras

Los criterios para la aceptación o el rechazo de una muestra deben definirse por adelantado y

aplicarse durante la recepción de las muestras. Dichos criterios deben centrarse en las condiciones de transporte, la documentación complementaria, la integridad de los envases, la identificación adecuada y la cantidad de muestra (suficiente para el análisis y almacenamiento en biobanco, si las muestras se van a almacenar con otros fines de investigación). Con el fin de seguir un procedimiento único y aplicar el mismo criterio a todas las muestras recibidas, se puede aplicar el plan ilustrado en la figura 1.

Figura 1. Plan para la recepción de muestras



^a El embalaje debe estar sellado correctamente y no deben observarse signos de manipulación.

^b Se debe definir por adelantado el plazo máximo entre el momento de obtención de la muestra y su llegada al laboratorio.

^c Si una o más preguntas de los cuestionarios son cruciales para la interpretación de los resultados o representan un criterio de inclusión o exclusión, estas deberán verificarse.

^d Se debe comprobar el estado de la bolsa de plástico con cierre hermético. Todas las muestras deben estar adecuadamente identificadas y se comprobará la congruencia entre los códigos de ID de las muestras y de los cuestionarios.

^e La cantidad de muestra es un aspecto crucial. Si la cantidad de la muestra es insuficiente para llevar a cabo el análisis químico, se rechazará.

1.9. Preparación de alícuotas de las muestras

La preparación de alícuotas de la muestra puede tener lugar en el hospital o en el laboratorio tras su transporte desde el hospital. Las alícuotas de las muestras de orina deben prepararse de conformidad con las buenas prácticas de laboratorio y las directrices de seguridad del laboratorio además de usar el correspondiente equipo protector. Es necesario calcular el número y el volumen de las alícuotas requeridas para evitar ciclos de congelación y descongelación. Se debe consultar con el laboratorio que efectuará el análisis qué volumen deben tener las alícuotas y cuál es el volumen mínimo requerido para el análisis.

A continuación, se enumeran todos los tubos necesarios para la preparación de alícuotas.

1. Tubo U1 (mercurio):
 - a. Verter 5 ml de orina (¡no pipetearla!) en un tubo de plástico libre de metales pretratado con ácido sulfámico antes de la toma de la muestra. Agitar bien después de añadir la orina al tubo.
 - b. Congelar y almacenar a -20 °C.
2. Tubo U2 (creatinina):
 - a. Verter 5 ml de orina en un tubo de polipropileno de 15 ml.
 - b. Congelar y almacenar a -20 °C.
3. Tubos adicionales: la orina restante puede verterse en tubos separados para utilizarla en otros análisis. También se recomienda almacenar en el biobanco fracciones de orina de 10 ml o 40 ml a -80 °C, en uno o más tubos de polipropileno.

Nota. Para garantizar la homogeneidad de la alícuotas, agitar la muestra original antes de preparar cada alícuota.

1.10. Almacenamiento y conservación

Las muestras que vayan a ser almacenadas durante más de un mes deben ser congeladas. Dado que la orina contiene numerosas sales inorgánicas, es posible que se forme un precipitado incluso tratándose de orina fresca. Por tanto, antes del análisis es necesario agitar la muestra para homogeneizarla. También existe un método que aumenta la solubilidad de las sales, para lo cual se reduce el pH de la muestra de orina añadiendo una pequeña cantidad de ácido clorhídrico. Adopte las medidas necesarias para asegurarse de que no se produzca una proliferación de microorganismos, ya que pueden reducir el mercurio inorgánico a mercurio gas y este podría liberarse y perderse de la muestra. Se estima que el nivel medio de mercurio en orina de la población general en una región sin una exposición particular al mercurio es inferior a 10 ng/ml. Se ha demostrado que, a -20°C, el mercurio se mantiene estable durante un año.

En general, los especímenes se transportan y almacenan a -20°C. Deben establecerse procedimientos de almacenamiento de muestras para controlar la ubicación de las muestras, el número de alícuotas restantes, etc. Al recibir las muestras, deben, congelarse a -20°C hasta el momento del análisis. El analista debe guardar las muestras restantes en el congelador después de preparar las alícuotas de trabajo, y volver a congelarlas a -20°C. La estabilidad de las muestras que se hayan descongelado y vuelto a congelar varias veces no se verá afectada, aunque al almacenarlas se les haya añadido conservantes.

1.11. Control de calidad

1.11.1. Trazabilidad

La trazabilidad de las muestras a lo largo del estudio es un aspecto crucial y por ello, deben tomarse las medidas necesarias para garantizarla. Como se ha mencionado anteriormente, es fundamental etiquetar correctamente las muestras y los documentos relacionados, pero también es necesario poder vincular las muestras con la información facilitada por los voluntarios. Se recomienda mantener un registro de las muestras (anexo 3). Para ello, debe diseñarse una base de datos en la que pueda almacenarse esta información. Debe restringirse el acceso al archivo o documento cuando contenga información personal confidencial.

Si una muestra estuviera asociada a más de un código de ID (por ejemplo, las alícuotas de las muestras pueden tener diferentes códigos), o si tuviera que asignarse un código interno a las muestras cuando llegan al laboratorio, todos estos códigos deben quedar registrados en la base de datos.

2. Análisis de la concentración de mercurio total presente en la orina

El método descrito en el presente procedimiento operativo estándar es adecuado para determinar la concentración de mercurio total en orina humana en población general con baja exposición al mercurio, así como en las personas expuestas por motivos ocupacionales. El método se basa en la digestión ácida, la reducción y la medida por espectrometría de absorción atómica de vapor frío. Se trata de un método simple y sensible, promovido por el Instituto Nacional para la Enfermedad de Minamata (Japón), y diseñado para que se adecue a instrumentos que requieran un mantenimiento sencillo (12).

En aquellos casos en los laboratorios dispongan de equipo alternativo para la detección del mercurio en muestras digeridas en ácido, es recomendable seguir las instrucciones facilitadas por el fabricante del instrumento. Las instrucciones para la toma y manipulación de muestras incluidas en el presente procedimiento operativo estándar son adecuadas independientemente del instrumental utilizado para la determinación del mercurio. Es necesario comprobar el límite de detección y el límite de cuantificación a fin de asegurarse de que son adecuados para el análisis de muestras de orina humana.

2.1. Alcance del método

El procedimiento descrito se refiere al tratamiento y el procesamiento de la muestra después de preparar sub-álícuotas para el análisis de mercurio. La concentración de mercurio total en orina de una población no expuesta normalmente oscila entre 0,1 y 5 ng/ml. En los casos de exposición a mercurio inorgánico y elemental se han observado valores de hasta 10 ng/ml; no obstante, en lugares de trabajo con frecuencia se registran niveles superiores a 50 ng/ml. El método descrito puede abarcar los intervalos comunicados normalmente en población general, así como en las sometidas a exposición ocupacional.

2.2. Fundamento teórico

Las muestras de orina son digeridas por ácidos y el mercurio se detecta por espectrometría de absorción atómica de vapor frío. Este proceso se basa en la reducción del mercurio iónico de la solución a su estado elemental y su subsiguiente transferencia a la celda de absorción del analizador de mercurio para su medida a 253,7 nm. El proceso de medida se basa en el sistema de circulación abierta de aire, el cual requiere aire ambiente limpio como gas portador, lo que facilita la utilización del equipo.

En la actualidad existen numerosos detectores para la medida de mercurio, basados ya sea en la absorción atómica o en la espectrometría de fluorescencia atómica. Los procedimientos utilizados por los laboratorios deben cumplir las instrucciones proporcionadas por los fabricantes del instrumento (13, 14). Véase también el *Procedimiento operativo estándar para la evaluación de la concentración de mercurio total en el cabello, la sangre y la orina con un método alternativo*.

2.3. Medidas de seguridad

Aplicar las medidas generales de seguridad: al manipular fluidos o tejidos corporales humanos, usar guantes, bata de laboratorio y gafas de seguridad. Colocar todos los objetos desechables de plástico, vidrio y papel (por ejemplo, las puntas de pipeta, los tubos del muestreador automático y los guantes) que entrarán en contacto con fluidos biológicos humanos, como la orina, en una bolsa de autoclave para sustancias biológicas peligrosas. Mantener estas bolsas en contenedores apropiados hasta que se sellen y se esterilicen en el autoclave.

Al finalizar, limpiar todas las superficies en las que se manipularon fluidos biológicos humanos con una solución de hipoclorito de sodio al 10% (v/v) o su equivalente. Se recomienda usar el pedal del

Micromedic Digiflex, ya que reduce el contacto del analista con las superficies de trabajo, además de dejar las manos libres para realizar el resto de operaciones. Desechar todas las muestras biológicas y los especímenes diluidos en una bolsa de autoclave para sustancias biológicas peligrosas, de conformidad con las directrices relativas a la eliminación de residuos peligrosos.

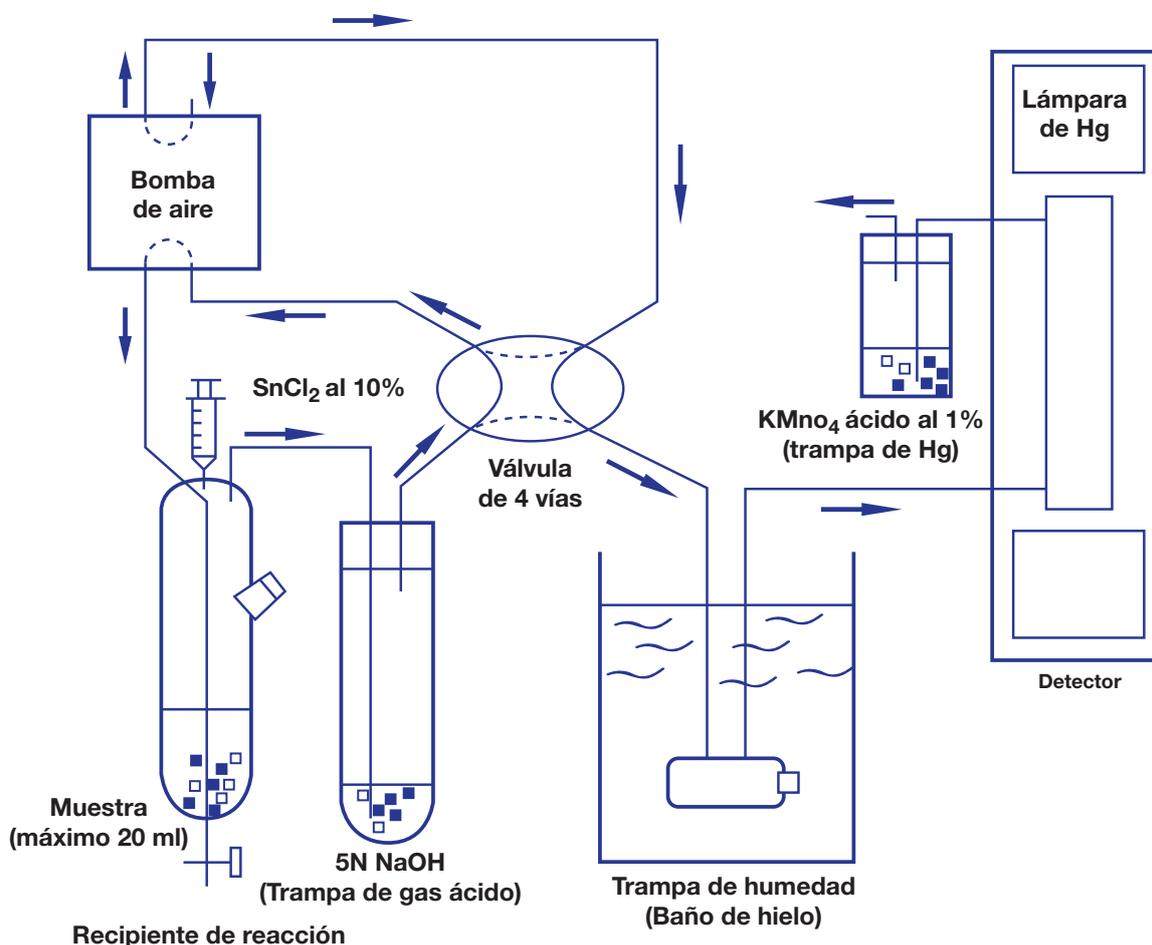
2.4. Equipo, materiales y soluciones

2.4.1. Equipo

El método descrito en el presente procedimiento operativo estándar consiste en la reducción de los iones de mercurio inorgánico presentes en la solución de muestra de ensayo con cloruro de estaño, a fin de generar vapor de mercurio elemental, y la introducción del vapor de mercurio en la celda de absorción del analizador de mercurio para medir la absorbancia a 253,7 nm. Este método emplea un sistema de circulación abierta de aire, como se muestra en la figura 2. El equipo constituye un sistema cerrado y comprende una bomba de diafragma, un recipiente de reacción, una trampa ácida de gas, una trampa de humedad (baño de hielo) y una válvula de 4 vías.

Durante su funcionamiento, el vapor elemental generado por la adición de cloruro de estaño circula durante 30 segundos por la válvula de 4 vías a una velocidad de entre 1 y 1,5 l/min, lo que permite que el vapor de mercurio alcance un equilibrio entre la fase gaseosa y la fase acuosa. A continuación, la válvula de 4 vías gira 90° para introducir toda la fase gas en la celda de absorción de una vez. Este equipo completa la medida en un minuto y medir hasta 0,1 ng de mercurio con gran exactitud y precisión.

Figura 2. Diagrama esquemático de la reducción y la espectrometría de absorción atómica de vapor frío (sistema de circulación abierta de aire)



Fuente: Akagi 1997 (12).

2.4.2. Materiales

Para analizar la concentración de mercurio total en orina se requiere el siguiente material:

- un analizador de mercurio: analizador de mercurio semiautomático modelo Hg-201;
- una placa calefactora: capaz de alcanzar una temperatura superficial de 250 °C;
- un matraz para la digestión de la muestra: matraz aforado de Pyrex, de pared gruesa y 50 ml de capacidad (150 mm de altura total y cuello de 13 mm de diámetro interior);
- matraces aforados: 10, 100 y 1.000 ml;
- pipetas de medida: 0,2, 0,5, 1,5 y 10 ml; también pueden usarse pipetas automáticas (de 0,1 a 10 ml);
- centrifuga;
- un medidor de flujo múltiple: kit de medidores de flujo tipo V4.

2.4.3. Reactivos y sustancias químicas

Para analizar la concentración de mercurio total en la orina se requieren los siguientes reactivos y sustancias químicas:

- Ácido nítrico y ácido perclórico (1+1): mezclar 100 ml de ácido perclórico (para análisis de metales tóxicos) en 100 ml de ácido nítrico (para análisis de metales tóxicos). Conservar en un lugar fresco y sin luz.
- Ácido sulfúrico (para análisis de metales tóxicos).
- Agua destilada: destilar agua desionizada y almacenar en un recipiente de vidrio limpio.
- Ácido clorhídrico (calidad analítica).
- Ácido sulfámico 2 M: llenar parcialmente con agua bidestilada un tubo cónico de polipropileno de 50 ml, preanalizado o prelavado con ácido. Añadir 10 g de ácido sulfámico. Completar con agua bidestilada hasta los 50 ml. Mezclar bien para disolver el ácido sulfámico (para facilitar la mezcla puede emplearse un agitador de vórtice o un baño de agua caliente). Conservar a temperatura ambiente. Caduca al cabo de un año de su preparación.
- Solución de cloruro de estaño (II) al 10%: disolver 10 g de cloruro de estaño (II) deshidratado (calidad analítica) en 9 ml de ácido clorhídrico y diluir con agua destilada hasta completar un volumen de 100 ml. Airear con gas nitrógeno (100 ml/min, 20-30 minutos) para expulsar el mercurio que quede en la solución.
- Hidróxido de sodio 5 M: disolver 20 gr de hidróxido de sodio (calidad analítica) en agua destilada y llevar a un volumen final de 100 ml.
- Hidróxido de sodio 0,1 M: diluir una parte de hidróxido de sodio 5N con 50 partes de agua destilada.
- Ácido sulfúrico 2 M: añadir gradualmente 30 ml de ácido sulfúrico (para análisis de metales tóxicos) a agua destilada hasta completar un volumen final de 1.000 ml.
- Solución de permanganato de potasio al 0,5%: disolver 0,5 g de permanganato de potasio (calidad analítica) en agua destilada hasta completar un volumen final de 100 ml. Se usa para limpiar los recipientes de vidrio.

2.4.4. Patrones de calibración

Solución patrón de mercurio inorgánico

Pesar 13,5 mg de cloruro de mercurio (II) (patrón) en un matraz aforado de 100 ml, disolverlo en 4 ml de solución ácido nítrico/ ácido perclórico (1+1) y 10 ml de ácido sulfúrico y llenar hasta la marca con agua destilada para obtener solución madre de mercurio (1 ml de la solución madre = 100 µg de mercurio). Esta disolución es estable durante varios años si se cierra herméticamente y se conserva en un lugar fresco y preservándola de la luz. Cada vez que se usa, la solución madre se

diluye en 10.000 partes de la solución de ensayo en blanco descrita para obtener así una solución patrón de mercurio (1 ml de esta solución = 0,010 µg de mercurio). Este proceso debe llevarse a cabo en dos pasos consecutivos y a una temperatura ambiente de entre 20 °C y 23 °C.

Solución patrón de mercurio

El Instituto Nacional de Normas y Tecnologías (NIST) suministra, para fines de calibración, una solución patrón de mercurio (SRM 3177) preparada con cloruro de mercurio (II) de alta pureza. Una unidad de este material consta de cinco ampollas de vidrio de borosilicato y cada una de ellas contiene aproximadamente 10 ml de solución. La solución contiene una cantidad certificada de mercurio de 1 mg/g de fracción de masa nominal. Las soluciones de trabajo se preparan diluyendo de forma apropiada con un factor de dilución de 10.000. La solución de calibración de trabajo se prepara en dos pasos para obtener una concentración de 0,010 µg/ml.

2.5. Calibración

El método de la curva de calibración de múltiples puntos no siempre es necesario, ya que la curva de calibración es lineal en un amplio intervalo de concentraciones. Por tanto, se utiliza el método de la curva de calibración de tres puntos. Además de la solución blanco, debe elegirse la concentración de patrón (por ejemplo, 0,01, 0,03 o 0,05 µg de mercurio/50 ml) más adecuada para medir la concentración de mercurio total, con una altura del pico cercana a la de la muestra. En este caso, durante las medidas debe utilizarse el mismo volumen de patrón y de muestra para facilitar la cuantificación.

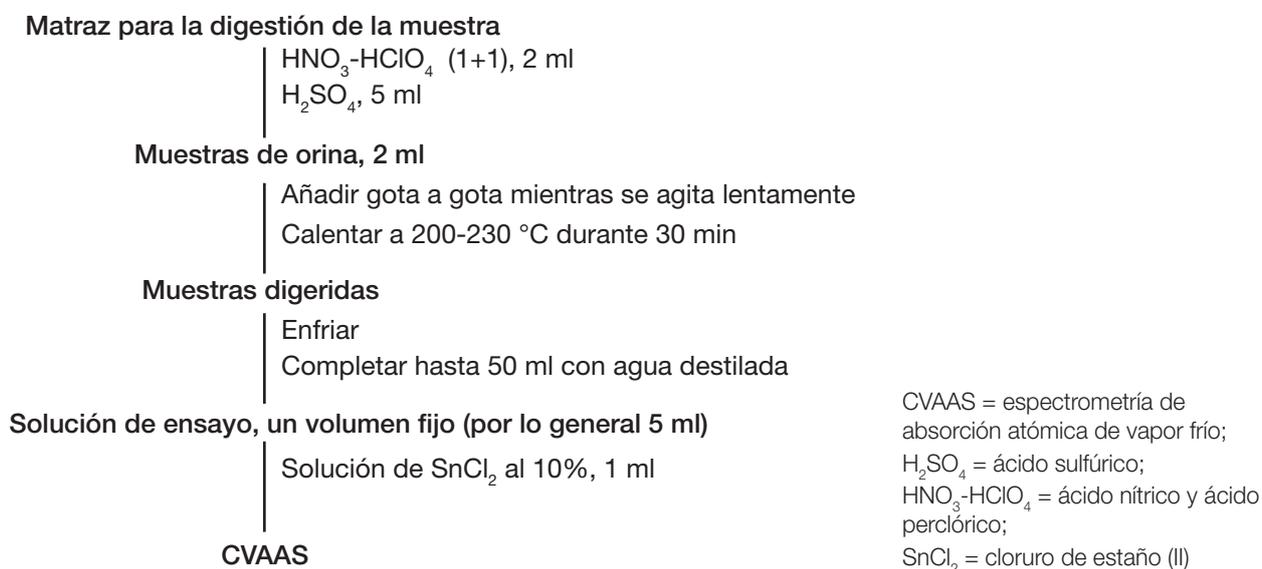
2.6 Procedimiento

2.6.1. Digestión ácida

En la figura 3 se ilustra el procedimiento empleado para determinar la concentración de mercurio total en orina. Introducir previamente 2 ml de la solución de ácido nítrico / ácido perclórico (1+1) y 5 ml de ácido sulfúrico en un matraz de digestión de muestras. Añadir de forma gradual un volumen conocido (por lo general 2 ml) de la muestra de orina mientras se agita lentamente. Seguir los mismos pasos para preparar las disoluciones del blanco y del patrón.

Cada muestra debe prepararse por duplicado. El blanco se prepara de la misma manera que la muestra, pero sin añadir la orina. El patrón se prepara de la misma manera que la muestra, pero añadiendo la solución patrón en lugar de orina. Se requieren al menos 3 puntos de calibración que normalmente deben abarcar el rango comprendido entre 0,5 y 5 ng/ml.

Figura 3. Evaluación de la concentración de mercurio total presente en la orina



Los matraces con las muestras deben calentarse durante 30 minutos sobre una placa calefactora a 200-230°C. Una vez fríos, añadir agua destilada hasta completar un volumen final de 50 ml, mezclar bien y usar las soluciones resultantes como soluciones de muestra de ensay

2.6.2. Medida

El equipo automático usado para este análisis se comercializa con el nombre de “analyzer de mercurio semiautomático modelo Hg-201”.

Transferir con cuidado un volumen conocido de la solución de ensayo (por lo general 5 ml, hasta un máximo de 10 ml) al recipiente de reacción del analyzer de mercurio y a continuación, añadir agua libre de mercurio hasta la marca de 20 ml y tapar. Agregar con el accesorio dispensador 1 ml de cloruro de estaño (II) al 10% a la solución de ácido clorhídrico 1N, y presionar el botón de inicio. La bomba de diafragma se activará y hará circular a través de la válvula de 4 vías, el vapor de mercurio elemental generado entre el recipiente de reacción y la trampa de gas ácido durante 30 segundos, hasta alcanzar el equilibrio entre las fases gaseosa y líquida. El gas ácido generado por la muestra se recoge en la solución alcalina. Al cabo de 30 segundos, la válvula de 4 vías girará automáticamente 90° permitiendo que el vapor de mercurio entre en la celda de absorción a través de un baño de hielo para medir la absorbancia. Las lecturas del detector aumentarán y disminuirán bruscamente, formando un pico pronunciado. Cuando comiencen a disminuir, abrir la válvula situada en la parte inferior del recipiente de reacción para descartar la solución que contiene, cerrarla y dejar que se airee hasta que vuelva a sus niveles iniciales. Presione el botón de reinicio para comenzar con la siguiente medida. En primer lugar se medirán los blancos y a continuación, los patrones. Si la curva de calibración es aceptable, pueden medirse las soluciones de las muestras.

Nota. La concentración necesaria para lograr el equilibrio entre la fase acuosa y la fase gaseosa del mercurio reducido y vaporizado puede diferir en función de la concentración del ácido y el volumen de la muestra en el momento de la medida. Por tanto, la solución de blanco se utiliza para diluir la muestra, y tanto esta como los patrones se miden en las mismas condiciones en todos los aspectos (concentración y volumen de ácido).

2.7 Cálculo de los resultados analíticos

Las alturas de los picos (mm) obtenidas después de medir los volúmenes conocidos de los blancos, patrones y muestras (o sus soluciones diluidas) se etiquetan como “ P_{blank} ” (blanco), “ P_{std} ” (patrón) y “ P_{sample} ” (muestra). La concentración total de mercurio de la muestra se calcula según la siguiente fórmula:

$$c_{sample} = \left(\frac{P_{sample} - P_{blank}}{P_{std} - P_{blank}} \right) \cdot F \cdot \frac{c_{std}}{m_{sample}}$$

c_{sample} : concentración de mercurio en la muestra (ng/ml o ng/g)

c_{std} : concentración de mercurio en el patrón (ng/ml); por ejemplo, 10 ng/ml

P_{sample} : altura del pico, en mm, correspondiente a la muestra digerida (para 5 ml tomados de los 50 ml de la muestra digerida)

P_{std} : altura del pico, en mm, correspondiente a la solución patrón (se preparó 1 ml de solución patrón de 10 ng/ml de la misma manera que la muestra, y para la medida se cogieron 5 ml de los 50 ml de esa muestra)

P_{blank} : altura del pico, en mm, de la solución de ensayo en blanco

F: factor de dilución del patrón (para este caso el factor de dilución fue de 0,1; se diluyó 1 ml de la solución patrón de 10 ng/ml hasta completar 50 ml, de los cuales se cogieron 5 ml para efectuar la medida)

m_{sample} : masa de la muestra en g o ml

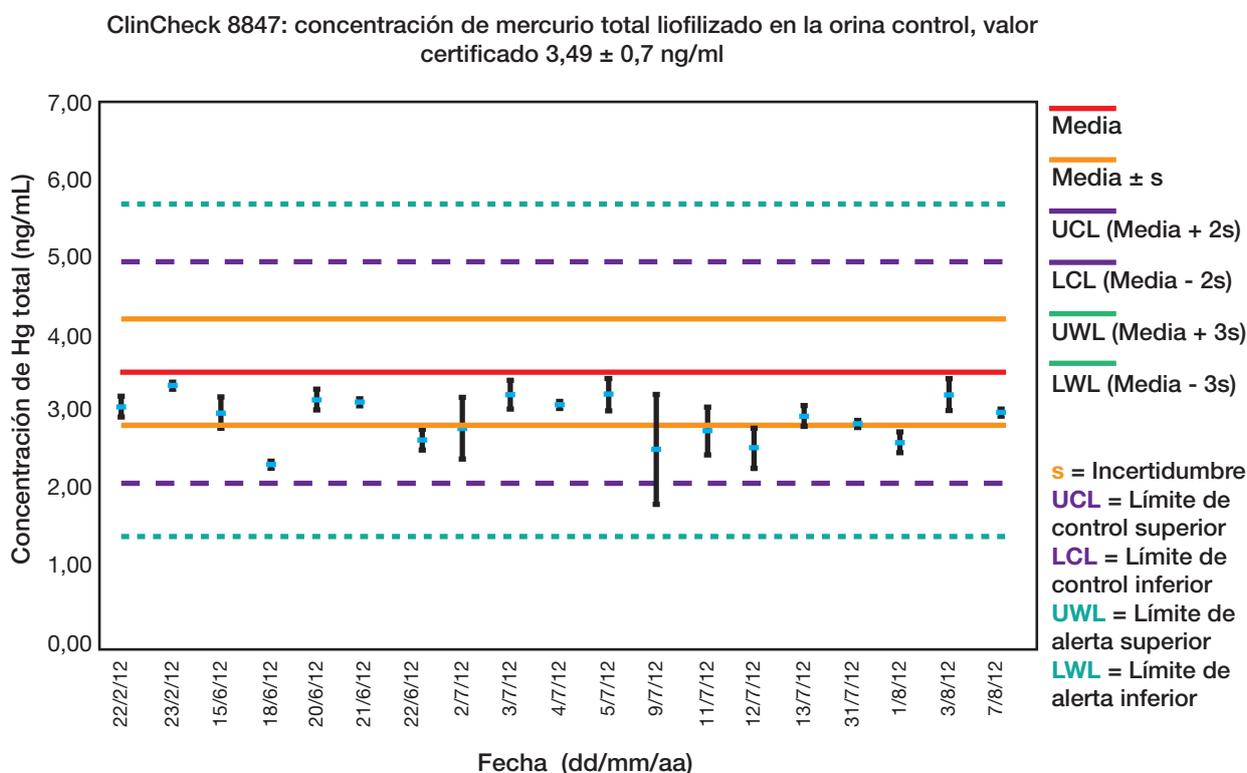
2.8. Control de calidad

En la elaboración del presente procedimiento operativo estándar se utilizaron dos materiales de referencia: Clin Chek 8847 (Recipe, Alemania) y Seronorm Trace Elements Urine, blanco (Sero As, Noruega). El laboratorio debe obtener materiales de referencia certificados para la medida de mercurio en orina en concentraciones similares a la del rango esperado en la muestra.

Cada muestra debe analizarse por duplicado y si el resultado del análisis difiere en más del 10%, se debe volver a analizar la muestra.

En cada serie de análisis se medirán los tres blancos y los duplicados del material de control de calidad (preferiblemente material de referencia) y se prepararán los gráficos de control de calidad (figura 4).

Figura 4. Gráfico de control de calidad (ClinChek 8847)



2.9. Evaluación del método

Cada laboratorio debe cumplir la norma ISO/IEC 17025:2005 “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración” (15). El método debe validarse en lo relativo a sus criterios de desempeño (sensibilidad, linealidad, recuperación, solidez, precisión, exactitud, límite de detección, etc.), y acompañarse de una estimación de la incertidumbre de medida, ya que esta constituye una propiedad fundamental del resultado y un requisito de la norma ISO/IEC 17025:2005. Los niveles de concentración de mercurio en la orina son bajos; por tanto, para poder medir las concentraciones presentes en la población general, el límite de detección debe ser de al menos 0,05 ng/ml y el límite de cuantificación de al menos 0,1 ng/ml.

A continuación, se especifican los criterios de desempeño aplicados en el presente procedimiento operativo estándar, así como el procedimiento empleado para la estimación de la incertidumbre de medida.

2.9.1. Límite de detección y límite de cuantificación

El límite de detección se determinó mediante la evaluación del contenido de mercurio en 10 soluciones blanco. La concentración de mercurio en 50 ml de la solución blanco fue de $0,10 \pm 0,010$ ng. El límite de detección se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$LOD = 3 \cdot SD_{blank}$$

SD: desviación típica

A continuación, se calculó el límite de detección de la muestra:

$$LOD = \frac{3 \cdot SD_{blank}}{V_{sample}(m_{sample})}$$

V_{sample} : volumen (ml) o masa (en g) de la muestra

m_{sample} : masa de la muestra en g o ml

En el caso anterior, el límite de detección fue de 0,03 ng/50 ml, y el límite de cuantificación para una muestra de 2 ml fue de 0,015 ng/ml.

Para calcular el límite de cuantificación, se multiplicó el límite de detección por cinco.

$$LOQ = 5 \cdot LOD$$

En el ejemplo anterior, el límite de cuantificación es de 0,075 ng/ml.

2.9.2. Precisión

Como medida del grado de reproducibilidad del método analítico descrito se realizan análisis periódicos de muestras de orina durante un período de tiempo prolongado (por ejemplo, un año). Como ejemplo, en la tabla 2 se muestran los resultados de una serie de medidas ($n=15$) de la concentración de mercurio total en la orina. Se analizaron dos réplicas de cada muestra.

Tabla 2. Resultados de las medidas por duplicado de la concentración de mercurio total en las muestras de orina y sus diferencias relativas

Muestra	Resultado D1 (ng/ml)	Resultado D2 (ng/ml)	Valor medio (D1+D2)/2	Diferencia (D1-D2)	Diferencia relativa (D1-D2)/media
Orina 1	2,02	1,62	1,82	0,40	0,22
Orina 2	0,71	0,63	0,67	0,08	0,12
Orina 3	0,51	0,51	0,51	0,00	0,00
Orina 4	0,54	0,51	0,53	0,03	0,06
Orina 5	1,19	1,27	1,23	-0,08	-0,07
Orina 6	0,67	0,67	0,67	0,00	0,00
Orina 7	1,66	1,62	1,64	0,04	0,02
Orina 8	3,80	3,76	3,78	0,04	0,01
Orina 9	0,59	0,55	0,57	0,04	0,07
Orina 10	0,61	0,69	0,65	-0,08	-0,12
Orina 11	0,69	0,69	0,69	0,00	0,00
Orina 12	0,61	0,55	0,58	0,06	0,10
Orina 13	0,92	0,98	0,95	-0,06	-0,06
Orina 14	0,72	0,70	0,71	0,02	0,03
Orina 15	0,79	0,74	0,77	0,05	0,07

D1 = medida 1; D2 = medida 2.

Para evaluar la reproducibilidad o repetibilidad, se calcula la desviación típica de las medidas duplicadas por medio de la ecuación siguiente.

$$RSD_d = \frac{S_d}{\sqrt{n}}$$

RSDd = RSD_d: desviación típica relativa de las medidas de las réplicas

S_d: desviación típica de las diferencias relativas ((D1-D2)/media)

n: número de réplicas (n=2)

Se calculó que la repetibilidad para las medidas realizadas fue del 5,9%.

2.9.3. Veracidad

La veracidad de los resultados se estimó usando el material de referencia ClinChek Urine Controls (Level I). Como medida de la veracidad, la recuperación (*R*) se calculó a partir de medidas del material de referencia durante el transcurso de seis meses. Los niveles observados se compararon con el valor de referencia aplicando la siguiente ecuación:

$$R = \frac{\text{valor observado}}{\text{valor de referencia}}$$

R = recuperación

En la tabla 3 se muestra un ejemplo de medidas de la concentración de mercurio total en el material de referencia.

Tabla 3. Medidas de la concentración de mercurio total en ClinChek Urine Controls (Level I)

Fecha	Valor medio (ng/ml)	Valor de referencia (ng/ml)	Recuperación (%)
fecha 1	2,99	3,49	86
fecha 2	3,27	3,49	94
fecha 3	2,94	3,49	84
fecha 4	2,28	3,49	65
fecha 5	3,10	3,49	89
fecha 6	3,05	3,49	87
fecha 7	2,69	3,49	77
fecha 8	2,73	3,49	78
fecha 9	3,22	3,49	92
fecha 10	2,99	3,49	86
fecha 11	3,18	3,49	91
fecha 12	2,72	3,49	78
fecha 13	2,57	3,49	74
fecha 14	2,86	3,49	82
fecha 15	2,80	3,49	80
fecha 16	2,62	3,49	75
fecha 17	3,26	3,49	93
fecha 18	2,97	3,49	85

A partir de las medidas proporcionadas en la tabla 3, se calculó una recuperación del 83%.

2.9.4. Incertidumbre de medida

La incertidumbre en la medida de la concentración de mercurio total en orina por digestión ácida y espectrometría de absorción atómica de vapor frío se calculó de conformidad con el enfoque y los datos de validación establecidos en la “Guía para la expresión de la incertidumbre de medida” de la ISO. El proceso se describe en la guía EURACHEM/CITAC “Cuantificación de la incertidumbre en medidas analíticas” (16).

Paso 1. Se calculó el valor del mensurando por medio de la expresión cuantitativa que lo relaciona con los parámetros de los que depende (descritos en la sección 2.7).

$$c_{sample} = \left(\frac{P_{sample} - P_{blank}}{P_{std} - P_{blank}} \right) \cdot F \cdot \frac{c_{std}}{m_{sample}}$$

Paso 2. A partir de la expresión cuantitativa, se identificaron las fuentes de incertidumbre. Estas incluyen los parámetros enumerados en la tabla 4.

Tabla 4. Componentes de la incertidumbre de la concentración de mercurio total en orina

Parámetro de entrada	Valor	Incertidumbre típica	Incertidumbre típica relativa (%)
Señal de la muestra (P_{sample})	30,0 mm	0,5 mm	1,6
Masa de la muestra (m_{sample})	20 mg	0,06 mg	0,29
Volumen de la muestra en el matraz aforado (V_{tot})	50 ml	0,12 ml	0,24
Volumen de la alícuota de la muestra analizada ($V_{analysed}$)	5 ml	0,0095 ml	0,2
Concentración de la solución patrón (C_{std})	10 ng/ml	0,014 ng/ml	0,14
Volumen de la solución patrón (V_{std})	0,1000 ml	0,00094 ml	0,94

Paso 3. En este paso se cuantificaron los componentes de la incertidumbre. Todas las contribuciones a la incertidumbre deben expresarse como incertidumbres típicas, es decir, como desviaciones típicas.

Las incertidumbres típicas de los componentes identificados en la expresión cuantitativa se obtuvieron a partir de datos experimentales (por ejemplo, los volúmenes de las pipetas) o del certificado del fabricante (por ejemplo, la balanza o el matraz aforado).

En la tabla 4 se indican las incertidumbres típicas estimadas. En el cálculo de la incertidumbre de medida no se tienen en cuenta las incertidumbres típicas relativas que no excedan el 10% de la mayor contribución a la incertidumbre. Entre las incertidumbres enumeradas, se identificaron como significativas las relativas a la altura del pico (u_p) y al volumen de la solución patrón (U_{Vstd}).

El resto de los componentes de la incertidumbre se calcularon a partir de los datos de validación y para ello, se emplearon los datos sobre la reproducibilidad (repetibilidad) y la recuperación.

La incertidumbre de la repetibilidad (u_{rep}) fue del 5,9% (sección 2.9.2), mientras que la incertidumbre de la recuperación ($u(R_m)$) fue del 8,5% y se calculó aplicando la siguiente ecuación:

$$u(\bar{R}_m) = \bar{R}_m \times \sqrt{\frac{s_{obs}^2}{n \cdot \bar{C}_{obs}^2} + \frac{u(C_{ref})^2}{C_{ref}^2}}$$

\bar{R}_m : recuperación

s_{obs} : desviación típica de los datos observados

\bar{C}_{obs} : valor medio de los datos observados

C_{ref} : valor de referencia

$u(C_{ref})$: incertidumbre del valor de referencia

Finalmente, en el paso 4, se calculó la incertidumbre combinada. Antes de combinarlas, es necesario expresar todas las contribuciones a la incertidumbre como incertidumbres típicas (desviaciones típicas). La incertidumbre combinada (u_c) se calculó de la siguiente manera:

$$u_c = \sqrt{u_p^2 + u_{vstd}^2 + u_{rep}^2 + u_{rec}^2}$$

u_c : incertidumbre combinada

u_p : error debido a la repetición de las medidas

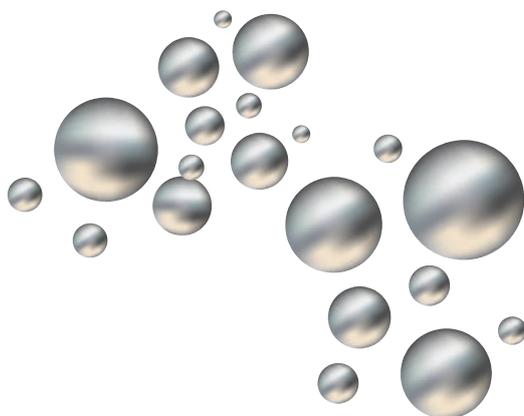
u_{vstd} : error debido a los patrones

u_{rep} : error debido a la reproducibilidad

u_{rec} : error debido a la recuperación

La incertidumbre expandida (U) se calculó multiplicando u_c por el factor k . La elección del factor k depende del nivel de confianza deseado. El valor de k necesario para un nivel de confianza aproximado del 95% es 2.

La incertidumbre de medida estimada en la determinación de la concentración de mercurio total en orina por digestión ácida y espectrometría de absorción atómica de vapor frío es del 11%, y del 22% para la incertidumbre expandida ($k=2$). Este cálculo es válido para un intervalo "normal" de exposición, es decir, por debajo de 5 ng/ml.



3. Análisis del contenido de creatinina en la orina

La concentración de mercurio y otras sustancias químicas en la orina puede variar significativamente en función de su contenido de agua y por esta razón, los análisis de contaminantes en la orina con frecuencia se expresan en microgramos de compuesto por gramo de creatinina (3). La creatinina es un subproducto del metabolismo de las proteínas en los músculos que se forma a partir del fosfato de creatinina. La creatinina se excreta casi por completo tras su filtración glomerular en los riñones. Los adultos de entre 30 y 60 años, con un peso corporal normal, excretan en promedio entre 1,0 y 1,6 g de creatinina al día.

La formación fisiológica de creatinina en individuos sanos es, en esencia, proporcional a su masa muscular, lo que explica por qué la excreción de creatinina es en general menor en las mujeres que en los hombres. En los niños, la excreción diaria de creatinina depende mucho de la edad. Además de la edad y el sexo, otro factor que influye considerablemente en la excreción de creatinina es el consumo de carne, así como el consumo de determinados medicamentos, como los opiáceos y los diuréticos. La producción de orina puede variar considerablemente en función de la ingesta, la pérdida de líquidos y el consumo de café, alcohol o medicamentos. En cambio, la excreción de creatinina generalmente se mantiene relativamente constante a lo largo del día, con ligeras fluctuaciones diurnas. Por esta razón, la concentración de creatinina en la orina suele utilizarse como valor de referencia para el análisis de compuestos químicos y sus metabolitos en la orina, ya que permite compensar las variaciones diurnas en la dilución de la orina a la hora de evaluar la exposición a dichos compuestos. No obstante, no siempre es conveniente vincular la concentración de xenobióticos y creatinina en orina y además como se ha mencionado anteriormente, deben tenerse en cuenta los factores que pueden influir en la excreción de creatinina.

En los casos en los que una gran parte del xenobiótico se reabsorbe en la región tubular de los riñones, no puede asumirse que sus concentraciones sean directamente proporcionales a las de la creatinina (17, 18). Asimismo, cuando las muestras de orina están muy diluidas o concentradas, utilizar el contenido de creatinina como valor de referencia también conduce a una estimación incorrecta de la concentración de la sustancia de interés.

Por esta razón, la Comisión para la Investigación de los Peligros para la Salud de las Sustancias Químicas en el Lugar de Trabajo desaconseja, en principio, calcular la concentración de sustancias peligrosas o sus metabolitos en la orina en función de la concentración de creatinina.

A pesar de ello, cuando se analiza la concentración de sustancias peligrosas o sus metabolitos en orina debe medirse la concentración de creatinina en cada muestra para evaluar así los resultados obtenidos. Los resultados obtenidos en muestras de concentraciones de creatinina inferiores a 0,5 g/L o superiores a 2,5 g/L (17) no deberían considerarse válidos.

3.1. Alcance del método

El método aquí descrito se basa en la reacción de Jaffé (19) y determinar el contenido de creatinina en la orina a escala miniaturizada mediante un lector fotométrico de microplacas de forma rápida y exacta con un límite de detección de 0,004 mg de creatinina/ml de orina.

La principal ventaja de este método reside en que permite analizar un gran número de muestras en tiempo reducido. Además, resulta sencillo mantener estables las condiciones de la reacción ya que todas las muestras se analizan al final de la reacción, lo que minimiza el riesgo de fluctuaciones temporales en la medida.

3.2. Principio técnico

Las muestras de orina, diluidas en una proporción de 1:50, se colocan en una microplaca y se añade ácido pícrico e hidróxido de sodio. Tras un tiempo de reacción de 30 minutos, se mide con

un espectrofotómetro de microplacas la absorbancia del producto de la reacción a una absorbancia máxima de 500 nm.

La calibración se lleva a cabo con soluciones de patrón acuosas de creatinina, que se tratan de la misma manera que las muestras, es decir, se les añade una solución de ácido pícrico e hidróxido de sodio y se miden por espectrofotometría.

3.3. Medidas de seguridad

Al analizar la concentración de creatinina en orina deben adoptarse las medidas de seguridad siguientes:

- Al trabajar con orina deben adoptarse las medidas de seguridad relativas a los peligros biológicos.
- La dilución de las muestras de orina debe realizarse en una cámara de seguridad biológica.
- Al manipular las soluciones, se deben utilizar guantes, bata de laboratorio y gafas de seguridad.
- Los desechos y residuos biológicos deben depositarse en los contenedores apropiados. Las puntas de pipeta, los tubos del muestreador automático, los guantes y otros objetos que hayan entrado en contacto con la orina deben colocarse en un contenedor o bolsa de autoclave para sustancias biológicas peligrosas.

3.4. Equipo, materiales y soluciones

3.4.1. Equipo

Para analizar la concentración de creatinina en orina se requiere los siguientes equipos:

- un agitador de vórtice para mezclar las muestras de orina antes de extraer la alícuota de trabajo;
- una micropipeta de 10 100 μL ;
- una micropipeta de 100 1.000 μL ;
- una micropipeta de 1 10 ml;
- una micropipeta multicanal de 50 300 μL ;
- una balanza analítica (precisión: 0,01 ml);
- una centrifuga;
- un agitador de microplacas;
- un espectrofotómetro;
- un congelador (para el almacenamiento a largo plazo de las muestras y los reactivos);
- un refrigerador (para el almacenamiento intermedio de los patrones y los reactivos);
- un sistema de purificación de agua (para obtener el agua bidestilada ultrapura para la preparación de los reactivos y la dilución): este equipo produce agua desionizada de más de 18 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$.

3.4.2. Material

Para analizar la concentración de creatinina en orina se requiere el siguiente material:

- guantes (sin talco, de látex o nitrilo, con un bajo desprendimiento de partículas);
- puntas de pipeta (1.000 μL , 100 μL y 10 ml);
- microplacas de 96 pocillos;
- tubos de ensayo de polipropileno de 1, 5, 10 y 50 ml.

3.4.3. Reactivos y sustancias químicas

Para analizar la concentración de creatinina en la orina se requieren los siguientes reactivos y sustancias químicas:

- agua ultrapura;
- ácido pícrico al 1,2 %;
- hidróxido de sodio (calidad analítica);
- ácido clorhídrico al 37%.

3.4.4. Materiales de referencia

Para analizar la concentración de creatinina en orina se requiere el siguiente material de referencia:

- creatinina SRM 914a (Instituto Nacional de Normas y Tecnologías);
- soluciones de control de calidad URN ASY CONTROL niveles 2 y 3 (Randox Laboratories).

3.4.5. Soluciones

Para analizar la concentración de creatinina en la orina se requieren las siguientes soluciones:

- Ácido clorhídrico 0,1 M: se transfieren 871 μL de ácido clorhídrico al 37% a un matraz aforado de 100 ml y se añade agua ultrapura hasta su volumen nominal.
- Hidróxido de sodio 0,3 M: se pesan 3 g de hidróxido de sodio y se disuelven en aproximadamente 100 ml de agua ultrapura. Transferir a un matraz aforado de 250 ml y añadir agua ultrapura hasta su volumen nominal.
- Solución de trabajo de ácido pícrico: se transfieren 10 ml de la solución de ácido pícrico al 1,2% y 10 ml de hidróxido de sodio 0,3 M a un tubo de polipropileno de 50 ml. La solución de trabajo debe estar preparada en el momento y protegerse de la luz.

3.4.6. Patrones de calibración

Para este procedimiento operativo estándar deben usarse los siguientes patrones de calibración:

- Solución madre de creatinina (1 g/L): se pesan 10 mg de creatinina SRM 914a en un matraz aforado de 10 ml. A continuación, este se añade ácido clorhídrico 0,1 M hasta completar su volumen nominal. La solución madre se conserva a 4°C y caduca a los dos meses.
- Patrones de calibración: la solución madre de creatinina se diluye con agua ultrapura en matraces aforados de 10 ml, según la información de la tabla 5. Los patrones de calibración se almacenan a 4°C y caducan al cabo de una semana.

Tabla 5. Volumen y concentraciones para la preparación de los patrones de calibración

Volumen de la solución madre de creatinina (μL)	Volumen final del patrón de calibración (ml)	Concentración del patrón de calibración (g/L)	Concentración equivalente en las muestras de orina (g/L)
40	10	0,004	0,2
80	10	0,008	0,4
200	10	0,020	1,0
400	10	0,040	2,0
800	10	0,080	4,0

3.5. Tratamiento y preparación de la muestra

Para manipular las muestras deben utilizarse guantes sin talco.

Las muestras deben sacarse del refrigerador con antelación para que alcancen la temperatura ambiente antes del análisis. A continuación, se agitan en el agitador de vórtice y se centrifugan a 3.000 rpm durante dos minutos. Cada serie de análisis debe incluir dos muestras comerciales de orina para control de calidad en distintas concentraciones (Assayed Urine Chemistry Control Level 2 y Level 3). Cada uno de los viales se reconstituye con 10 ml de agua bidestilada y se deja reposar 30 minutos a temperatura ambiente antes de usarlo. Puede dividirse en alícuotas y almacenarse a -20°C durante dos semanas.

Las muestras y los controles de calidad diluidos a 1:50 se preparan por triplicado. A continuación, se pipetea 20 µL de la muestra o el control de calidad en tubos de 1,5 ml y se añaden 980 µL de agua ultrapura, se tapan y se agitan para homogeneizar.

Después, se pipetea 25 µL del patrón, las muestras diluidas y los controles una microplaca de 96 pocillos según la distribución indicada en la tabla 6.

Se tapa la placa y se agita sobre un agitador orbital a temperatura ambiente protegida de la luz. Al cabo de 30 minutos, se lee la placa a 492 nm.

Tabla 6. Distribución de los patrones, las muestras y los controles en la microplaca

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	agua	agua	agua	P1	P1	P1	P2	P2	P2	P3	P3	P3
B	P4	P4	P4	P5	P5	P5	S1	S1	S1	S2	S2	S2
C	S3	S3	S3	S4	S4	S4	S5	S5	S5	S6	S6	S6
D	S7	S7	S7	S8	S8	S8	S9	S9	S9	S10	S10	S10
E	S11	S11	S11	S12	S12	S12	S13	S13	S13	S14	S14	S14
F	S15	S15	S15	S16	S16	S16	S17	S17	S17	S18	S18	S18
G	S19	S19	S19	S20	S20	S20	S21	S21	S21	S22	S22	S22
H	S23	S23	S23	S24	S24	S24	C1	C1	C1	C2	C2	C2

Notas:

P1: patrón acuoso de creatinina de 0,004 mg/ml

P2: patrón acuoso de creatinina de 0,008 mg/ml

P3: patrón acuoso de creatinina de 0,2 mg/ml

P4: patrón acuoso de creatinina de 0,4 mg/ml

P5: patrón acuoso de creatinina de 0,8 mg/ml

C1: dilución 1:50 del control de calidad URN ASY CONTROL 2

C2: dilución 1:50 del control de calidad URN ASY CONTROL 3

S1-S24: diluciones 1:50 de la muestra

3.6. Procedimiento

3.6.1. Preparación del equipo analítico

Encender el espectrofotómetro.

El sistema requiere de aproximadamente 15 minutos de precalentamiento antes de comenzar a efectuar la medida.

3.6.2. Medida de la muestra

Medir las muestras a 500 nm tal y como se indica en el apartado 7.1.

3.6.3. Cálculo de los resultados analíticos

El equipo interpola la lectura en la curva de calibración teniendo en cuenta la dilución de la muestra e indica directamente los resultados en mg de creatinina/ml.

El valor final indicado corresponde al valor medio tras realizar tres medidas por muestra. La desviación típica de estas medidas se puede calcular con la siguiente fórmula:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (c_i - \bar{c})^2}{n - 1}}$$

SD: desviación típica

c_i : valor individual

\bar{c} : media

n: número de determinaciones

3.6.4. Rango de resultados válidos

Debe comprobarse que los valores obtenidos correspondientes a los controles de calidad cumplen los criterios de aceptación establecidos en sus certificados de análisis. En caso contrario, es necesario repetir el análisis.

La desviación típica relativa de las tres medidas de una muestra no debe ser superior al 5%. Si esto no se cumple, debe aplicarse la prueba de Grubbs para determinar si alguno de los valores presenta una diferencia significativa.

$$Z = \frac{\text{Media} - \text{Valor sospechoso}}{SD}$$

Z: valor de Z (que se evaluará según la prueba de Grubbs)

SD: desviación típica

Si Z es superior a 1,15, se puede rechazar este valor y calcular la concentración de la muestra como la media de los dos valores restantes. De lo contrario, deberá volverse a analizar la muestra.

Los valores de creatinina válidos son los incluidos en el intervalo comprendido entre 0,3 y 3 mg/ml.

3.7. Control de calidad

La precisión y exactitud de los análisis de los biomarcadores efectuados por los laboratorios de toxicología deben comprobarse continuamente mediante procedimientos de aseguramiento de la calidad.

En general, las medidas de aseguramiento de la calidad aplicadas por los laboratorios médicos comprenden controles de calidad internos y externos, los cuales se detallan en la sección *Programa de control de calidad para la vigilancia biológica humana del mercurio*.

3.7.1. Control de calidad interno

El aseguramiento de la calidad interno conlleva la supervisión sistemática de la repetibilidad, a fin de detectar los errores aleatorios y comprobar la exactitud de las determinaciones cuantitativas del laboratorio.

En la práctica, la repetibilidad se comprueba mediante un material de control (material de referencia), que se incluye como parte en cada serie analítica. Los resultados de los controles de calidad internos diarios o por lotes se introducen en gráficos de control.

Si no existe en el mercado material de referencia, puede prepararse un material de control (materia de referencia) mediante el enriquecimiento de una muestra nativa (sangre, orina, etc.) con una cantidad conocida del analito de interés (biomarcador). Las alícuotas de esta muestra se pueden utilizar como control de calidad interno, así como en los programas de comparación entre laboratorios. Debe comprobarse que este material en condiciones de almacenamiento y transporte específicas y que, además, la concentración de analito permanece inalterable. El material de control debe abarcar todo el rango de concentraciones (por ejemplo, Qbaja, Qmedia, Qalta) e incluir también blancos.

La exactitud se analizará preferentemente por medio de un material de referencia certificado, es decir, un material (biológico) que contiene una concentración certificada de uno o más analitos. La certificación se lleva a cabo como parte de un programa en el que los laboratorios expertos en el análisis del biomarcador en cuestión analizan el material de control.

Tras un procedimiento de validación que comprende procedimientos estadísticos, además del juicio de expertos, se define un valor certificado para cada analito presente en la muestra. Esto hace que los materiales de referencia certificados sean costosos y por ello, solo deben utilizarse al validar o revalidar un método analítico.

3.7.2. Control de calidad externo

El control de calidad externo permite mejorar la comparabilidad y la exactitud de los resultados analíticos. La comparabilidad es el estado previo de la exactitud y garantiza que es posible comparar los resultados analíticos entre laboratorios y con los valores límite correspondientes.

Para poder aplicar medidas sanitarias preventivas, independientemente del laboratorio en el que analice la muestra biológica, es necesario que los resultados de los estudios de vigilancia biológica humana sean exactos y comparables.

Los estudios de comparabilidad entre laboratorios permiten armonizar los métodos analíticos y su aplicación, por lo que mejoran la comparabilidad de los resultados analíticos.

A tal fin, se pueden utilizar materiales de control (materiales de referencia). Los estudios de comparabilidad entre laboratorios son necesarios incluso cuando los laboratorios utilizan el mismo procedimiento operativo estándar para realizar los análisis.

Los sistemas de evaluación externa de la calidad permiten mejorar la exactitud de los resultados analíticos. Para ello, normalmente se analiza un material de control en laboratorios de referencia que han demostrado un nivel alto de competencia en el análisis de un biomarcador específico. A partir de los resultados obtenidos por los laboratorios de referencia se determinan los valores asignados y los intervalos de tolerancia correspondientes a los biomarcadores analizados. Los laboratorios que participan en un sistema de evaluación externa de la calidad obtienen la certificación de los resultados incluidos en el rango de tolerancia.

En el presente procedimiento operativo estándar, se utilizan materiales de control de calidad para evaluar la exactitud y precisión del proceso de análisis y determinar si el sistema analítico obtiene resultados de exactitud y precisión aceptables.

El control de calidad de los resultados analíticos se lleva a cabo con los materiales de referencia URN ASY CONTROL 2 y 3 (Randox).

Debe comprobarse que los valores obtenidos para los controles de calidad cumplen los criterios de aceptación establecidos en sus certificados de análisis. En caso contrario, será necesario repetir el análisis.

Únicamente se consideran válidas aquellas medidas obtenidas entre dos controles de calidad cuyos valores estén incluidos en el rango definido (valor asignado al material de referencia \pm la incertidumbre en dicho nivel).

El control de calidad externo consiste en la participación pruebas denominadas “round-robin”. A modo de ejemplo, se recomienda participar periódicamente en la evaluación externa de la calidad G-EQUAS organizada por el Instituto y Clínica Ambulatoria de Medicina Ocupacional, Social y Ambiental de la Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (Alemania).

3.8. Evaluación del método

3.8.1. Linealidad

La linealidad de un método analítico es la capacidad (dentro de un rango determinado) de obtener resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra. Este parámetro se evalúa mediante el estudio de concentraciones crecientes del analito. En el presente procedimiento operativo estándar, la linealidad del método se ha analizado en el intervalo comprendido entre 0,004 y 0,08 mg/ml de creatinina.

Los datos obtenidos se analizan estadísticamente para obtener la curva de regresión, el coeficiente de correlación, el coeficiente de regresión y el coeficiente de linealidad. Se debe obtener una curva lineal con un coeficiente de regresión superior a 0,999.

3.8.2. Precisión

Es una medida del grado de dispersión de los resultados analíticos debido a errores aleatorios. La precisión se describe estadísticamente por medio de la desviación típica o el intervalo de confianza. Se puede distinguir entre los siguientes tipos:

- precisión en condiciones repetidas (repetibilidad);
- precisión en condiciones comparables (reproducibilidad).

Para determinar la precisión se usaron muestras dentro del intervalo de 0,2 a 3 mg/ml. La tabla 7 muestra los resultados obtenidos para la repetibilidad y reproducibilidad.

Tabla 7. Máxima desviación típica permitida

Concentración (mg/ml)	RSD _{repet}	RSD _{reprod}
0,2	11,5	7,3
0,4	4,8	5,4
0,7	2,2	4,7
2,1	1,8	2,5
2,5	4,8	5,0

RSD_{repet}: desviación típica relativa de la repetibilidad;

RSD_{reprod}: desviación típica relativa de la reproducibilidad.

3.8.3. Exactitud

Es una medida de la desviación del valor medido con respecto al valor correcto (“verdadero”) a causa de un sesgo. Para comprobar la exactitud de un método existen diferentes alternativas:

- desempeño de las pruebas de recuperación (procedimientos de enriquecimiento);
- participación en estudios de comparabilidad entre laboratorios en los que los laboratorios de referencia autorizados definen el valor teórico;
- comparación del procedimiento analítico que se va a validar con un procedimiento de referencia certificado para la determinación del parámetro en la matriz de interés;
- comparación de los resultados del análisis de un material de referencia certificado con el valor de referencia certificado.

La exactitud se determinó añadiendo cantidades conocidas de creatinina a las muestras empleadas para determinar la precisión. Las tasas medias de recuperación obtenidas oscilaron entre el 98,2% y el 104,4%.

El límite de cuantificación inferior indica la concentración mínima de analito que se puede determinar con una incertidumbre predefinida (normalmente del 33%). El límite de cuantificación superior indica la concentración máxima de analito que puede determinarse.

El límite de cuantificación debe estar incluido en la curva de calibración y se puede calcular de varias formas.

Determinación de la relación señal-ruido de fondo

El ruido de fondo puede determinarse de la siguiente manera:

- La intensidad del ruido de fondo (s_0) se determina en relación al analito.
- El límite de detección es tres veces la intensidad media de la señal del ruido de fondo (límite de detección = $3 \times s_0$).
- El límite de cuantificación es nueve veces la intensidad media de la señal del ruido de fondo (límite de cuantificación = $9 \times s_0$).

Otros procedimientos

Es preciso advertir que los blancos en las muestras nativas influyen en la elección del método y el enfoque utilizados:

- procedimiento de la desviación típica (de acuerdo con EURACHEM);
- procedimiento del valor del blanco (de acuerdo con DIN 32 645);
- procedimiento de la curva de calibración (de acuerdo con DIN 32 645).

En este procedimiento operativo estándar, el límite de cuantificación se ha calculado utilizando el procedimiento de la curva de calibración, y el resultado obtenido corresponde al valor inferior de la curva de calibración, 0,004 mg/ml de creatinina.

3.9 Fuentes de error

Este método analítico se basa en la reacción de colorimétrica de Jaffé (19), en la que el grupo metileno activo de la creatinina reacciona con el átomo C3 de ácido pícrico (20, 21) formando un producto de reacción coloreado (19, 21). No obstante, esta reacción colorimétrica entre el ácido pícrico y la creatinina no es específica de esta sustancia. Como regla general, los compuestos reductores o los compuestos con un grupo metileno activado por $-\text{NO}_2$, $-\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2=\text{CH}_2$ -, $-\text{COOR}$ o $-\text{N}=\text{N}-$ también pueden formar productos coloreados. Así, mientras la glucosa, la fructosa, la maltosa, la hidroxilamina o el ácido ascórbico no causan interferencias, la aminoacetona, el ácido γ -aminolevulínico y el ácido aminoxiacético producen una reacción de colorimétrica con ácido pícrico (22).

Dado que las concentraciones de los cromógenos mencionados son muy bajas en la orina (20), la interferencia provocada puede considerarse insignificante. Por ejemplo, la concentración de ácido γ -aminolevulínico en la orina es entre 100 y 1.000 veces menor que la de creatinina.

La solución de ácido pícrico es sensible a la luz; por tanto, debe conservarse en un lugar oscuro, incluso durante la fase de incubación en la microplaca.

Al trabajar con microplacas es esencial asegurarse de no salpicar líquidos fuera de los pocillos al pipetear las soluciones, ya que podrían contaminarse el resto de muestras. Para evitarlo, se recomienda usar un dispensador manual móvil para pipetear la solución de ácido pícrico.

La suciedad (por ejemplo, las huellas digitales) en la parte inferior de la microplaca puede ocasionar interferencias considerables durante la medida, pudiendo incluso dar lugar a que la placa resulte ilegible para el espectrofotómetro. Por este motivo, la parte inferior de la placa debe mantenerse limpia y limpiarse con un paño humedecido con etanol antes de cada medida.

3.10. Método alternativo: determinación de la gravedad específica de las muestras de orina

Una alternativa al análisis de creatinina, es la determinación de la gravedad específica (SG) de las muestras de orina que permite también normalizar los niveles de mercurio en orina y evitar las diferencias interindividuales debidas a la dilución de la orina (23). Este método se emplea en numerosos estudios de vigilancia biológica humana. La gravedad específica se determina en una gota de orina mediante un refractómetro, un sencillo instrumento manual y de fácil manejo. El procedimiento descrito a continuación es aplicable al refractómetro PAL-10S de Atago (Japón), pero puede aplicarse a cualquier otro instrumento de características similares.

Se requiere el siguiente equipo:

- un refractómetro (por ejemplo, el PAL-10S de Atago [Japón]);
- contenedores para la recogida de orina (pueden ser los mismos que se emplean en el análisis de mercurio);
- una pipeta (0,1 - 1 ml);
- agua destilada;
- un paño de limpieza o toallitas desechables;
- guantes.

A continuación, se describe el procedimiento para la determinación de la gravedad específica de las muestras de orina.

1. Tanto el agua destilada empleada en la calibración (con el aparato ajustado a cero) como la muestra deben estar a temperatura ambiente.
2. Calibrar el refractómetro, depositando agua destilada (aproximadamente 0,3 ml) sobre la superficie del prisma y presionar el interruptor START. Si el visor indica "1.000", no es necesario poner el aparato en cero. Si indica un valor diferente a "1.000", dejar el agua sobre el prisma y pulsar el interruptor ZERO. El ajuste a cero se habrá efectuado correctamente cuando el visor indique "000". Retire el agua de la superficie del prisma con una toallita suave no abrasiva. Para garantizar la precisión de las medidas, esta operación debe realizarse antes de comenzar el análisis y aproximadamente cada 10 muestras.
3. Medida. Limpiar la superficie con agua destilada y secar con una toallita suave no abrasiva. Depositar una gota de orina (aproximadamente 0,3 ml) en la superficie del prisma. Pulsar el interruptor START. El valor de la medida aparecerá en la pantalla. Retire la muestra con una toallita suave, y limpie los restos con agua destilada. Seque el exceso de humedad con una toallita limpia y seca. Para apagar el visor, pulse y mantenga apretado el interruptor START aproximadamente dos segundos.

4. Cálculos. En los cálculos de normalización de la gravedad específica por lo general se toma como estándar una media de 1,013 para las mujeres y de 1,019 para los hombres; el cálculo se describe en la literatura (24).

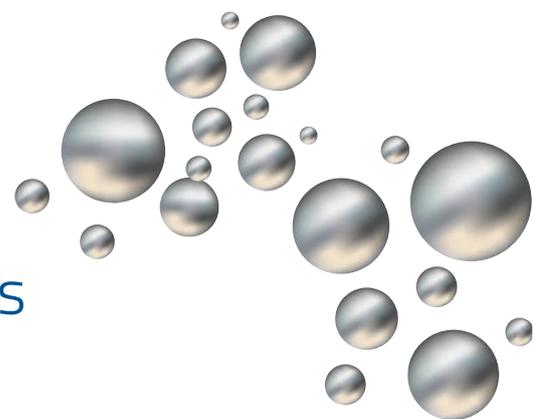
$$U_{biomarker}/SG = U_{biomarker} * \frac{(SG_{std} - 1)}{(SG_{ob} - 1)}$$

$U_{biomarcador}$: nivel de una sustancia (por ejemplo, mercurio) medido en la orina

SG_{ob} : gravedad específica observada

SG_{std} : gravedad específica media en la población estudiada

La gravedad específica por lo general oscila entre 1.000 (equivalente a la del agua) hasta 1.035 (muy deshidratada), pudiendo alcanzar niveles más elevados.



4. Interpretación de los resultados

Por lo general se considera que los niveles de mercurio en la orina constituyen la mejor medida de la exposición reciente a mercurio inorgánico o a vapores de mercurio elemental, ya que se considera que es el mejor indicador de los niveles de mercurio presentes en los riñones (25). No obstante, el mercurio inorgánico se acumula en los riñones y se excreta lentamente a través de la orina. Por consiguiente, los niveles de mercurio también pueden reflejar una exposición al mercurio elemental o inorgánico sufrida hace tiempo (3).

Se ha observado una estrecha correlación entre los niveles de mercurio elemental en el aire inhalado y los niveles en la orina, a concentraciones medianas y altas. La concentración máxima de mercurio en la orina establecida por la OMS (26) es de 50 µg/g de creatinina. En personas no expuestas ocupacionalmente los niveles de mercurio en orina raras veces superan los 5 µg/g de creatinina (3).

En mineros que frecuentemente calientan amalgamas de oro y mercurio en recipientes abiertos se han encontrado niveles de mercurio en orina superiores a 20 µg/L. En los trabajadores de los establecimientos de venta de oro de algunos pueblos de la Amazonia se han detectado concentraciones muy elevadas de mercurio en orina (de hasta 1.168 µg/L). Los trabajadores de estas tiendas (que trabajan en un entorno confinado) presentan niveles de mercurio en orina superiores a los de los mineros que calientan amalgamas al aire libre. Al analizar la orina de los empleados de estos comercios de oro de Alta Floresta (estado de Mato Grosso, Brasil), en los que el oro se fundía en campanas de gases sin filtro, se observaron niveles de mercurio superiores a 20 µg/L en al menos 13 de los 17 trabajadores analizados (27).

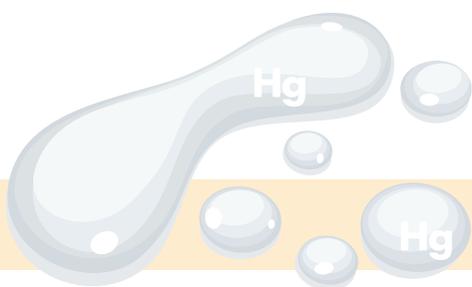
El valor de referencia establecido por la Comisión Alemana de Vigilancia Biológica Humana para adultos sin empastes dentales de amalgama es de 1 µg/L de orina, y de 0,4 µg/L en el caso de los niños (28). El valor guía basado en efectos en salud VBH-I es de 7 µg/L o de 5 µg/g de creatinina. En la mayoría de los países, las medias geométricas registradas en adultos se encuentran por debajo del valor de referencia (8).

Referencias

1. El mercurio y la salud [hoja informativa en línea]. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 2017.
2. Disponible en <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/mercury-and-health> (consultado el 11 de diciembre de 2017).
3. Health effects of exposure to mercury [sitio web]. Washington D. C.: Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos, 2017. Disponible en www.epa.gov/mercury/health-effects-exposuresmercury (consultado el 11 de diciembre de 2017).
4. Guidance for identifying populations at risk from mercury exposure. Ginebra: Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente y Organización Mundial de la Salud, 2008. Disponible en <https://www.who.int/foodsafety/publications/chem/mercuryexposure.pdf?ua=1> (consultado el 11 de diciembre de 2017).
5. *Promoting the phase down of dental amalgam in developing countries*. Ginebra: Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente y Organización Mundial de la Salud, 2014. Disponible en https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/13865/dental_mercury_phase_down_project_brochure_FINAL_lr.pdf?sequence=1&isAllowed=y (consultado el 11 de diciembre de 2017).
6. *Mercury in skin lightening products*. Ficha informativa de la OMS. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 2011. Disponible en http://www.who.int/ipcs/assessment/public_health/mercury_flyer.pdf (consultado el 11 de diciembre de 2017).
7. *Biomonitoring-based indicators of exposure to chemical pollutants. Report of a meeting,*
8. *Catania, Italy, 19–20 April 2012*. Copenhague, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud para Europa, 2012. Disponible en http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0004/170734/e96640.pdf?ua=1 (consultado el 11 de diciembre de 2017).
9. “Second Extraordinary Meeting of the European Environment and Health Task Force (EHTF)”. Informe de la reunión celebrada en La Haya (Países Bajos) del 31 de mayo al 1 de junio de 2012. Copenhague, Organización Mundial de la Salud, 2012. Disponible en http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0006/186027/e96820.pdf (consultado el 11 de diciembre de 2017).
10. *Human biomonitoring: facts and figures*. Copenhague, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud para Europa, 2015. Disponible en http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0020/276311/Human-biomonitoring-facts-figures-en.pdf?ua=1 (consultado el 11 de diciembre de 2017).
11. Barr D. B., Wilder L. C., Caudill S. P., González A. J., Needham L. L., Pirkle J. L. “Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: implications for urinary biologic monitoring measurements”. *Environmental Health Perspectives*. 2005, vol. 113, n.º 2, págs. 192 a 200. Disponible en
12. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1277864/> (consultado el 31 de enero de 2018).
13. Nuttall K. L. “Interpreting mercury in blood and urine of individual patients”. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 2004, vol. 34, n.º 3, págs. 235 a 250. Disponible en <http://www.annclinlabsci.org/content/36/3/248.full.pdf+html> (consultado el 31 de enero de 2018).

14. Aitio A., Järvisalo J., Kiilunen M., Tossavainen A., Vaittinen P. "Urinary excretion of chromium as an indicator of exposure to trivalent chromium sulphate in leather tanning". *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 1984, vol. 54, n.º 3, págs. 241a 249. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00379053> (consultado el 31 de enero de 2018).
15. Akagi H. "Analytical methods for evaluating human exposure to mercury due to gold mining". En: *Proceedings of the International Workshop on Health and Environmental Effects of Mercury due to Mining Operations*, Manila, 26 a 27 de noviembre de 1997. Minamata: Instituto Nacional para la Enfermedad de Minamata, 1998, págs. 113 a 141.
16. Horvat M., Gibičar D. "Speciation of mercury: environment, food, clinical, and occupational health". En: Cornelis R., Caruso J., Crews H., Heumann K., editores. *Handbook of elemental speciation II: species in the environment, food, medicine and occupational health*. Chichester: John Wiley & Sons; 2005, págs. 281 a 304.
17. Horvat M., Snoj Tratnik J., Miklavčič A. "Mercury: biomarkers of exposure and human biomonitoring". En: Knudsen L., Merlo D. F., editores. *Biomarkers and human biomonitoring*. Volumen 1. Ongoing programs and exposures. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2011, págs. 381 a 417.
18. ISO/IEC 17025:2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Ginebra: Organización Internacional de Normalización, 2005. Disponible en <https://www.iso.org/standard/39883.html> (consultado el 31 de enero de 2018).
19. Ellison S. L. R., Williams A., editores. *Eurachem/CITAC guide: Quantifying uncertainty in analytical measurement*. Tercera edición, 2012. Disponible en https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf (consultado el 18 de enero de 2018).
20. Weihrauch M., Schulze B., Schaller K. H., Lehnert G. "Kreatinin als Bezugsgröße für Stoffkonzentrationen in harn". En: Drexler H., Greim H., editores. *Biologische Arbeitsstößtoleranz-werte (BAT-Werte). Expositionsäquivalente für krebserzeugende Arbeitsstoffe (EKA) und biologische leitwerte (BLW)*. Deutsche Forschungsgemeinschaft-Arbeitsmedizinischtoxikologische begründungen, Spezielle Vorbemerkungen, vol 1. n.º 9. Wiley-VCH, 2000, págs. 21 a 31.
21. *Kommission Humanbiomonitoring des Urwelibundesamtes: Normierung von Stoffgehalten in urin-kreatinin*. Bundesgesundhbl, 2005, págs. 616 a 618.
22. Jaffé M. "Über den Niederschlag welchen Pikrinsäure in normalen Harn erzeugt und über eine neue reaction des Kreatinins". *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 1886, vol.10, págs. 391 a 400.
23. Butler A. R. "The Jaffé reaction. Identification of the coloured species". *Clinica Chimica Acta*, 1975, vol. 59, págs. 227 a 232. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0009898175900339?via%3Dihub> (consultado el 31 de enero de 2018).
24. Kakac B., Vejdelek Z. J. "Handbuch der photometrischen analyse organischer Verbindungen". 2.º volumen suplementario. Reaction mit 2,4,6-trinitrophenol (Pikrinsäure) und alkaline (basen). Weinheim: *Verlag-Chemie*, 1983, págs. 113 a 114.
25. Kakac B., Vejdelek Z. J. "Handbuch der photometrischen analyse organischer Verbindungen". *Reaction mit 2,4,6-trinitrophenol (Pikrinsäure)*. Weinheim: *Verlag-Chemie*, 1974, págs. 275 a 276.
26. Stajanko A., Falnoga I., Snoj Tratnik J., Mazej D., Jagodic M., Krsnik M. *et al.* "Low cadmium exposure in males and lactating females—estimation of biomarkers". *Environmental Research*. 2017, vol. 152, págs. 109 a 119. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013935116307009?via%3Dihub> (consultado el 31 de enero de 2018).

27. Suwazono Y., Åkesson A., Alfvén T., Järup L., Vahter M. "Creatinine versus specific gravity adjusted urinary cadmium concentration". *Biomarkers*, 2005, vol. 10, págs. 117 a 126. Disponible en <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13547500500159001?journalCode=ibmk20> (consultado el 31 de enero de 2018).
28. Clarkson T. W., Hursh J. B., Sager P. R., Syversen T. L. M. "Mercury". En: Clarkson T. W., Friberg L., Nordberg G. F., Sager P. R., editores. *Biological monitoring of toxic metals*. Nueva York: Plenum Press, 1988, págs. 199 a 246.
29. Directrices relativas al metilmercurio en el pescado. "Cuestiones de inocuidad de los alimentos asociadas con los productos de la acuicultura: informe de un grupo de estudio mixto FAO/RCAAP/OMS". OMS, Serie de Informes Técnicos, n.º 883. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 1999.
30. Veiga M. M., Baker R. *Protocols for environmental and health assessment of mercury released by artisanal and small-scale gold miners*. Viena: Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial, 2004.
31. Schulz C., Wilhelm M., Heudorf U., Kolossa-Gehring M. "Update of the reference and
32. HBM values derived by the German Human Biomonitoring Commission". *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2011, vol. 215, n.º 1, págs. 26 a 35. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438463911000794?via%3Dihub> (consultado el 31 de enero de 2018).



Anexo 1. Instrucciones de toma de orina para los participantes

Lea atentamente estas instrucciones antes de tomar la primera orina de la mañana.

Nota. Deben haber transcurrido al menos cinco horas desde la última micción.

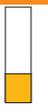
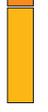
1. Entre en el retrete.
2. Lávese las manos con agua y jabón y séqueselas.
3. Extraiga el recipiente para la orina de la bolsa de plástico con cierre hermético. (Por favor, utilice únicamente el recipiente que le han proporcionado ya que ha sido tratado previamente para este estudio).
4. Desenrosque la tapa y abra el recipiente.
5. A continuación, recoja la primera orina de la mañana. Para ello, orine en el recipiente hasta que el nivel de orina llegue a la marca indicada.
6. Enrosque bien la tapa.
7. Vuelva a introducir el recipiente en la bolsa con cierre hermético.
8. Conserve la muestra a entre 4 °C y 8 °C hasta que la entregue al personal del centro de salud (24 horas como máximo).

Gracias por su cooperación.

Anexo 2. Cuestionario para la toma de muestras de orina

Nombre de la madre	
Número de historial médico	
ID del estudio de la madre	
Trabajador médico	Firma Nombre
1. ¿Se ha tomado la orina de la muestra por la mañana?	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
2. Fecha y hora de toma de la muestra	-----/-----/-----/ (día/mes/año) Inicio: -----/----- (hora/min)
3. ¿Cuándo orinó por última vez antes de la toma de la muestra?	__ _ horas
4. ¿Cuándo comió por última vez antes de la toma de la muestra?	__ _ hours
5. ¿Cuándo fue la última vez que comió pescado o marisco antes de la toma de la muestra?	<input type="checkbox"/> Hoy <input type="checkbox"/> Ayer <input type="checkbox"/> Anteayer

Anexo 3. Listado de recepción de muestras

Volumen	Orina			Preparación de las alícuotas de la muestra de orina	
	U1	U2	X U		
	Mercurio	Creatinina	Biobanco		
	 5 ml	5 ml 	x 40 ml o x 10 ml		
Temperatura de almacenamiento sobre el terreno y durante el transporte	Caja térmica	Caja térmica	Caja térmica		
Temperatura de almacenamiento en el laboratorio	-20 °C	-20 °C	-80 °C		
Número de identificación				Fecha	Hora
ID					
ID					
ID					
....					

Procedimiento operativo estándar para la determinación de la concentración de mercurio total en cabello, sangre y orina mediante un método alternativo

Resumen

Los procedimientos operativos normalizados alternativos están dirigidos a los laboratorios que tienen acceso a instrumentos de análisis por inyección en flujo y amalgamación con oro seguido de detección por espectrofotometría de absorción atómica de vapor frío o fluorescencia atómica de vapor frío. El procedimiento operativo estándar describe el procedimiento de digestión. El mercurio presente en las muestras digeridas puede entonces determinarse mediante un procedimiento de inyección en flujo o por espectrometría de fluorescencia atómica de vapor frío (o espectrometría de absorción atómica de vapor frío) con amalgamación con oro.

Palabras clave

Mercurio: análisis
Compuestos de metilmercurio: análisis
Sangre fetal: química
Cordón umbilical: química
Cabello: química
Orina: química
Biomarcadores: análisis
Inyección en flujo: análisis
Espectrofotometría atómica
Exposición ambiental

Colaboradores

Milena Horvat
Instituto Jožef Stefan, Ljubljana (Eslovenia)
Janja Snoj Tratnik
Instituto Jožef Stefan, Ljubljana (Eslovenia)
Vesna Fajon
Instituto Jožef Stefan, Ljubljana (Eslovenia)

Índice

Abreviaturas.....	140
1. Digestión ácida de las muestras biológicas	141
1.1. Alcance del método	141
1.2. Fundamento teórico	141
1.3. Medidas de seguridad.....	141
1.4. Digestión del material biológico.....	141
2. Determinación de la concentración de Hg total mediante análisis por inyección en flujo y detección por espectrometría de absorción atómica de vapor frío	144
2.1. Principio y aplicación	144
2.2. Equipo, materiales y soluciones.....	144
2.3. Análisis por espectrometría de absorción atómica de vapor frío	147
3. Determinación de la concentración de Hg total mediante doble amalgamación con oro y detección por espectrometría de fluorescencia atómica de vapor frío	150
3.1. Principio del método.....	150
3.2. Equipo, materiales y soluciones.....	150
3.3. Procedimiento analítico.....	154
3.4. Cálculos	156

Abreviaturas

BrCl	cloruro de bromo
CVAAS	espectrofotometría de absorción atómica de vapor frío
CVAFS	fluorescencia atómica de vapor frío
HCl	ácido clorhídrico
HgCl ₂	cloruro de mercurio
HNO ₃	ácido nítrico
KBr	bromuro de potasio
KBrO ₃	bromato de potasio
K ₂ Cr ₂ O ₇	dicromato de potasio
KMnO ₄	permanganato de potasio
SnCl ₂	cloruro de estaño
v/v	volumen/volumen
V ₂ O ₅	pentóxido de vanadio
p/v	peso/volumen

1. Digestión ácida de las muestras biológicas

1.1. Alcance del método

El método descrito tiene por objeto determinar la concentración de mercurio (Hg) total en muestras biológicas.

1.2. Fundamento teórico

El método es aplicable a todas las muestras biológicas con una concentración total de Hg superior a 1 ng/g. El objetivo de la digestión ácida fuerte es descomponer las muestras y oxidar y convertir las formas orgánicas de Hg en Hg inorgánico.

1.3. Medidas de seguridad

Deben aplicarse las medidas de seguridad generales. Al manipular sangre, plasma, suero, orina u otros fluidos o tejidos corporales humanos, deben utilizarse guantes, bata de laboratorio y gafas de seguridad. Colocar todos los objetos desechables de plástico, vidrio y papel (por ejemplo, las puntas de pipeta, los tubos del muestreador automático y los guantes) que entrarán en contacto con fluidos biológicos humanos, como la orina, en una bolsa de autoclave para sustancias biológicas peligrosas. Mantener estas bolsas en contenedores apropiados hasta que se sellen y se esterilicen en el autoclave.

Al finalizar, limpiar todas las superficies en las que se manipularon fluidos biológicos humanos con una solución de hipoclorito de sodio al 10% (v/v) o su equivalente. Se recomienda usar el pedal del Micromedic Digiflex™, ya que reduce el contacto del analista con las superficies de trabajo que han estado en contacto con fluidos biológicos humanos, además de dejar las manos libres para realizar el resto de operaciones. Desechar todas las muestras biológicas y los especímenes diluidos en una bolsa de autoclave para sustancias biológicas peligrosas, de conformidad con las directrices relativas a la eliminación de residuos peligrosos.

1.4. Digestión de material biológico

1.4.1. Equipo

- Botella de vidrio de 1 litro, previamente limpiada según el procedimiento indicado para los objetos de vidrio.
- Matraz aforado de 500 ml (clase A), previamente limpiado según el procedimiento indicado para los objetos de vidrio.
- Tubos de teflón (60 ml) con tapa, previamente limpiados según el procedimiento indicado para los objetos de teflón.
- Espátulas de polipropileno.
- Placa calefactora y bloque de aluminio.
- Balanza de precisión.

1.4.2. Limpieza de los objetos de vidrio

El material de vidrio debe lavarse cuidadosamente antes de su utilización, tal y como se explica a continuación:

- Dejar los recipientes de teflón y de vidrio en remojo toda la noche en una solución de detergente Micro-90 al 2%.

- Lavar exhaustivamente los recipientes, primero con agua del grifo y después con agua bidestilada.
- Enjuagar con una solución de permanganato de potasio (KMnO_4) al 0,5%.
- Enjuagar con agua hasta que el color de la solución de KMnO_4 no resulte visible.
- Llenar los recipientes con una solución de ácido clorhídrico (HCl) al 1% y almacenar en un lugar libre de Hg.
- Vaciar los tubos justo antes de usarlos para procesar las muestras y dejarlos secar a 60 °C en una campana de flujo.

1.4.3. Limpieza de los objetos de teflón

- Dejar los recipientes en remojo toda la noche en una solución jabonosa (solución de detergente Micro-90 al 2% en agua del grifo) en un contenedor de plástico.
- Lavarlos exhaustivamente, primero con agua del grifo y luego con agua bidestilada.
- Sumergir los recipientes en una solución de ácido nítrico concentrado al 50% (v/v) y calentar a 60 °C durante dos días.
- Enjuagar exhaustivamente con agua bidestilada (al menos cuatro veces).
- Transferir los recipientes a una solución de HCl concentrado al 10% (v/v) a temperatura ambiente durante un día (como mínimo).
- Enjuagar exhaustivamente con agua bidestilada (al menos cuatro veces).
- Guardar los recipientes en bolsas de polietileno. Cuando sea posible, llenar los recipientes (principalmente los de teflón y de vidrio) con una solución de HCl al 1%.

1.4.4. Reactivos y sustancias químicas

- HNO_3 (al 65%, calidad analítica, bajo en Hg)
- HCl (al 30%)
- Pentóxido de vanadio (V_2O_5) (extrapuro)
- Dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)
- Bromato de potasio (KBrO_3) (calidad analítica)
- Bromuro de potasio (KBr) (calidad analítica)
- Agua bidestilada desionizada (>18 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$)

Para oxidar las soluciones existen dos posibilidades:

$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ al 10% (p/v) en agua bidestilada

1. Pesar 50 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ en un matraz aforado de vidrio limpio de 500 ml.
2. Añadir aproximadamente 250 ml de agua bidestilada y agitar hasta que el $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ se disuelva.
3. Completar hasta la marca con agua bidestilada.

Solución oxidante de BrCl

1. Pesar con exactitud 11 g de KBrO_3 y 15 g de KBr en una botella de vidrio limpia de 1 litro.
2. Añadir 200 ml de agua bidestilada.
3. Agregar cuidadosamente 800 ml de HCl concentrado; la dilución debe llevarse a cabo en una campana de gases bien ventilada para evitar la exposición a los gases tóxicos liberados durante la disolución de KBrO_3 .
4. Envolver la botella en papel de aluminio.

Estas dos soluciones pueden conservarse durante un período ilimitado si se las almacena en la oscuridad, a temperatura ambiente, en un recipiente de teflón o una botella de vidrio, cerrados herméticamente y en un lugar libre de Hg.

1.4.5. Procedimiento

1. Agitar los tubos que contienen las muestras aproximadamente dos minutos para homogeneizarlas.
2. Esperar unos minutos antes de abrir los tubos.
3. Pesar con exactitud 0,5 - 1 ml de muestra de sangre, 20 - 100 mg de muestra de cabello o 1 - 2 ml de muestra de orina en tubos de teflón (60 ml).
4. Añadir 45 mg de V_2O_5 .
5. Añadir 5 ml de HNO_3 concentrado (o más si fuera necesario: la mezcla debe ser líquida).
6. Colocar la tapa y dejar en reposo durante al menos una hora a temperatura ambiente. Si la reacción es muy intensa, por seguridad, es conveniente dejar las muestras a temperatura ambiente toda la noche antes de calentarlas.
7. Colocar los tubos en un bloque de aluminio sobre una placa calefactora a $90^\circ C$ y dejarlos tres horas.
8. Antes de abrir los tubos, dejar que las muestras se enfríen hasta alcanzar la temperatura ambiente en una campana de gases, a fin de evitar los gases ácidos tóxicos.
9. Añadir aproximadamente 20 ml de agua bidestilada.
10. Agregar 1 ml de solución de $K_2Cr_2O_7$ (concentración final = 2% v/v), o 0,5 ml de solución de BrCl (concentración final = 1% v/v).
11. Diluir hasta la marca con agua bidestilada (volumen de la dilución = 57,5 ml).
12. Agitar los tubos y esperar a que el material se sedimente antes del análisis.

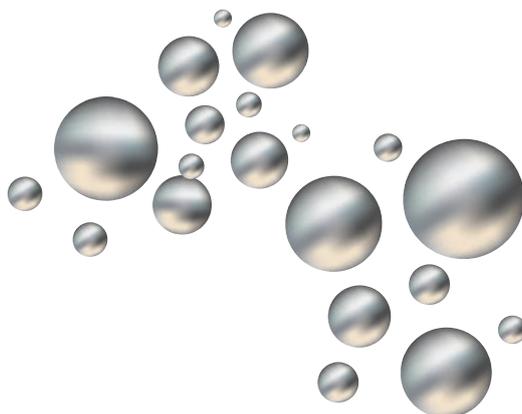
Estas muestras pueden conservarse unos días si se almacenan en el refrigerador ($+4^\circ C$) antes de llevar a cabo el análisis. El tiempo máximo de almacenamiento debe determinarse experimentalmente para cada tipo de muestra.

1.4.6. Blancos de reactivo

Para cada lote analizado deben prepararse al menos tres blancos de la misma forma en que se prepararon las muestras, excepto que no se añade ninguna muestra a los tubos de digestión.

1.4.7. Materiales de referencia

Para cada lote analizado debe usarse y prepararse por triplicado al menos un material de referencia certificado. Estas digestiones se preparan de igual manera que la de la muestra. La composición y la concentración de Hg en el material de referencia certificado deben ser similares a las presentes en las muestras.



2. Determinación de la concentración de Hg total mediante análisis por inyección en flujo y detección por espectrometría de absorción atómica de vapor frío

2.1. Principio y aplicación

Las muestras biológicas se mineralizan con ácidos fuertes. El mercurio inorgánico se reduce a su forma elemental con cloruro de estaño mediante el procedimiento de inyección en flujo. El vapor frío de Hg se separa de las muestras digeridas en un separador gas-líquido y a continuación, pasa por la celda de cuarzo del espectrómetro de absorción atómica, donde se determina la concentración. El haz de luz de la lámpara de mercurio de cátodo hueco pasa a través de la celda de cuarzo hasta el monocromador, incidiendo finalmente en el detector, que mide la cantidad de luz absorbida por el vapor atomizado en la celda. La cantidad de energía absorbida a la longitud de onda característica es proporcional a la concentración del elemento en la muestra.

2.2. Equipo, materiales y soluciones

2.2.1. Equipo

Espectrómetro de absorción atómica Varian-Spectra AA-10 y accesorio de generación de vapor VGA-76 u otro sistema equivalente basado en el principio de inyección en flujo.

2.2.2. Materiales

- Micropipetas.
- Botellas de teflón de 125 ml, previamente limpiadas según el procedimiento indicado para los objetos de teflón.
- Balanza de precisión.
- Matraces aforados de vidrio de entre 50 ml y 1.000 ml (clase A), previamente limpiados según el procedimiento empleado para los objetos de vidrio.

2.2.3. Limpieza de los objetos de vidrio

Antes de usarlos, lavar exhaustivamente todo el material de laboratorio de vidrio tal y como se indica a continuación:

- Dejar los recipientes de teflón y de vidrio en remojo toda la noche en una solución de detergente Micro-90 al 2%.
- Lavar exhaustivamente los recipientes, primero con agua del grifo y luego con agua bidestilada.
- Enjuagar con una solución de KMnO_4 al 0,5%.
- Enjuagar con agua hasta que el color de la solución de KMnO_4 no resulte visible.
- Llenar los recipientes con una solución de HCl al 1% y almacenar en un lugar libre de Hg.
- Vaciar los tubos justo antes de procesar las muestras y dejarlos secar a 60°C en una campana de flujo.

2.2.4. Limpieza de los objetos de teflón

- Dejar los recipientes en remojo toda la noche en una solución jabonosa (solución de detergente Micro-90 al 2% en agua del grifo) en un contenedor de plástico.
- Lavarlos exhaustivamente, primero con agua del grifo y luego con agua bidestilada.
- Sumergir los recipientes en una solución de ácido nítrico concentrado al 50% (v/v) y calentar a 60 °C durante dos días.
- Enjuagar exhaustivamente con agua bidestilada (al menos cuatro veces).
- Transferir los recipientes a una solución de HCl concentrado al 10% (v/v) a temperatura ambiente durante un día (como mínimo).
- Enjuagar exhaustivamente con agua bidestilada (al menos cuatro veces).
- Guardar los recipientes en bolsas de polietileno. Cuando sea posible, llenar los recipientes (principalmente los de teflón y de vidrio) con una solución de HCl al 1%.

2.2.5. Reactivos y sustancias químicas

- HNO₃ (al 65%, calidad analítica, bajo en Hg)
- K₂Cr₂O₇ (calidad analítica, bajo en Hg)
- KBr
- KBrO₃
- Cloruro de estaño (SnCl₂) (calidad analítica, normal o bajo en Hg)
- HCl (al 30%)
- Cloruro de mercurio (HgCl₂) (sal) o solución patrón de Hg (1.000 mg/L)
- Agua bidestilada desionizada (>18 MΩ·cm)
- Argón (puro)

2.2.6. Soluciones de reactivos

SnCl₂ al 20% p/v en HCl al 20% v/v (200 ml)

1. Pesar en un vaso de precipitado de vidrio limpio y con ayuda de una espátula de plástico exactamente 40 g de SnCl₂ (tanto el vaso como la espátula solo se usan para el SnCl₂).
2. Añadir 40 ml de HCl concentrado directamente al SnCl₂ y transferir el contenido a un matraz aforado de 200 ml. Mezclar y esperar a que el SnCl₂ se disuelva por completo.
3. Agregar agua bidestilada hasta enrasar a 200 ml.
4. Si el SnCl₂ lleva tiempo almacenado, tal vez sea necesario calentar la solución sobre una placa calefactora para poder disolverlo completamente (no dejar que hierva).
5. Para muestras con una baja concentración, si el SnCl₂ utilizado no es “bajo en Hg”, será necesario purgarlo con nitrógeno durante dos horas antes de usarlo.
6. Esta disolución debe prepararse a diario.

Nota: el material empleado en la preparación de la solución de SnCl₂ debe mantenerse separado del resto de material de laboratorio para evitar la contaminación cruzada del material empleado en la determinación de elementos traza.

HNO₃ al 10% v/v (500 ml)

1. Introducir aproximadamente 400 ml de agua bidestilada en un matraz aforado de 500 ml.
2. Agregar cuidadosamente 50 ml de HNO₃ concentrado.
3. Completar hasta enrasar con agua bidestilada.
4. Agitar bien.

Esta solución puede almacenarse si se conserva en un recipiente cerrado herméticamente.

Para oxidar las soluciones existen dos posibilidades:

K₂Cr₂O₇ al 10% (p/v) en agua bidestilada

1. Pesar 50 g de K₂Cr₂O₇ en un matraz aforado de vidrio limpio de 500 ml.
2. Añadir aproximadamente 250 ml de agua bidestilada y agitar hasta que el K₂Cr₂O₇ se disuelva.
3. Enrasar hasta la marca con agua bidestilada.

Solución oxidante de BrCl

1. Pesar con exactitud 11 g de KBrO₃ y 15 g de KBr en una botella de vidrio limpia de 1 litro.
2. Añadir 200 ml de agua bidestilada.
3. Agregar cuidadosamente 800 ml de HCl concentrado; la dilución debe llevarse a cabo en una campana de gases bien ventilada para evitar la exposición a los gases tóxicos liberados durante la disolución del KBrO₃.
4. Envolver la botella en papel de aluminio.

Estas dos soluciones pueden conservarse durante un período ilimitado si se las almacena en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente, en un recipiente de teflón o una botella de vidrio, cerrados herméticamente y en un lugar libre de Hg.

2.2.7. Soluciones patrón de mercurio

Solución patrón madre 1: 1 mg/ml de Hg en ácido nítrico al 10%

1. Pesar exactamente 1,354 g de HgCl₂ en un matraz aforado de vidrio de 1 litro.
2. Añadir aproximadamente 500 ml de agua bidestilada.
3. Agregar 10 ml de HNO₃ concentrado (bajo en Hg).
4. Completar hasta la marca con agua bidestilada.
5. Agitar bien hasta lograr una que se disuelva completamente.
6. Transferir a una botella de teflón de 1 litro.
7. Cerrar bien con una llave dinamométrica y conservar en el refrigerador (+4 °C).

Solución patrón madre 2: 1 µg/ml de Hg en HNO₃ al 4%

1. Pesar 95 g de agua bidestilada en una botella de teflón de 125 ml.
2. Agregar 4 ml de HNO₃ concentrado (bajo en Hg).
3. Añadir 1 ml de solución de BrCl (o 2 ml de solución de K₂Cr₂O₇).
4. Agregar 100 µl de la solución madre 1 (1 mg/ml de Hg).
5. Agitar bien.
6. Cerrar bien con una llave y conservar en el refrigerador (4°C).

Recta de calibrado (al menos tres patrones y calibración a cero)

1. Introducir aproximadamente 10 ml de agua bidestilada en un matraz aforado de vidrio limpio, de 50 ml.
2. Añadir los reactivos de la misma forma que en el caso de las muestras digeridas ($\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ 2:1, o HNO_3).
3. Añadir con una micropipeta una cantidad apropiada de solución patrón madre (solución madre 1 o solución madre 2, dependiendo de la concentración de las muestras).
4. Añadir 1 ml de solución de BrCl (o 2 ml de solución de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$).
5. Diluir hasta la marca de 50 ml con agua bidestilada.
6. Agitar bien.

Estas soluciones también deben prepararse diario.

2.3. Análisis por espectrometría de absorción atómica de vapor frío

2.3.1. Curva de calibración

Preparar soluciones patrón con al menos tres concentraciones patrón más una solución de concentración cero. Este blanco debe prepararse de la misma manera que las soluciones patrón, pero sin añadir el patrón de Hg.

Si las muestras no se encuentran dentro de la curva de calibración, será necesario diluirlas con la misma matriz o preparar una nueva curva de calibración.

2.3.2. Condiciones del instrumento

- Longitud de onda: 253,7 nm;
- Corriente de la lámpara: 4 mA;
- Ancho de paso: 0,5 nm;
- Agente reductor (SnCl_2 al 20% en HCl al 20%): 1 ml/min;
- Agua bidestilada: 1 ml/min;
- Solución de enjuague (HNO_3 al 10%) o de muestra: 6,5 ml/min;
- Gas inerte: argón.

2.3.3. Optimización del espectrómetro de absorción atómica

Las siguientes instrucciones son aplicables al espectrómetro de absorción atómica Varian-Spectra AA-10 y al VGA-76 u otro sistema equivalente basado en el principio de inyección en flujo. Si se utiliza otro instrumento, deben seguirse las instrucciones del fabricante.

1. Comprobar que el disco de la llama esté insertado en el instrumento.
2. Encender la impresora y, a continuación, el espectrómetro.
3. Pulsar INDEX.
4. Seleccionar PROGRAM DIRECTORY.
5. Seleccionar el número de programa para mercurio y pulsar RECALL PROGRAM.
6. El parámetro METHOD debe ser:
 - element no.: 24;
 - instrument mode: ABS;
 - calibration: debe ser CONCENTRATION;
 - measurement: debe ser INTEGRATION.

7. INSTRUMENT PARAMETER debe ser:
 - lamp position (el instrumento reconoce automáticamente el código de la posición de las lámparas);
 - lamp current: 4 mA;
 - sample introduction: MANUAL;
 - delay time (seconds): 70;
 - measurement time (seconds): 5,0;
 - replicates: 3;
 - background correction: ON.
8. Instalar la lámpara de Hg en la posición correcta.
9. Ir a NOTE. En esta página, se indica la concentración correspondiente a una respuesta de 0,2 ABS.
10. Seleccionar la anchura de paso (0,5) y la longitud de onda del monocromador (253,7 nm).
11. Ir a OPTIMIZATION. Este paso se realiza sin que la celda de absorción se encuentre en el paso de luz del espectrómetro. La pantalla muestra dos barras: una indica el nivel de energía de la lámpara de Hg y la otra el de la lámpara de deuterio. Comprobar que el quemador no obstruye la luz. Llevar al máximo la energía de la lámpara optimizando sucesivamente la longitud de onda y la posición de la lámpara; efectuar estos ajustes dos veces. Si la barra indicadora es demasiado grande, pulsar RESCALE. Tras la optimización, la energía de las dos lámparas debe ser similar. Si aparece el mensaje TOO LOW DEUTERIUM LAMP (o TOO HIGH), activar (o desactivar) la atenuación de la lámpara de deuterio.
12. Comprobar el valor del fotomultiplicador (aproximadamente 294 mV) y apuntarlo en el registro.
13. Instalar la celda de absorción en el cabezal del quemador y comprobar que el haz de luz atraviese la celda cerca del centro.
14. Ir a STANDARDS e introducir las concentraciones patrón que definirán la recta de calibrado.

2.3.4. Manejo del generador de vapor

1. Encender el flujo de argón. El flujo de gas debe estar regulado al mínimo y la luz naranja generador de vapor apagada.
2. Introducir los tres tubos capilares de teflón en las soluciones apropiadas:
 - (i) solución de SnCl_2 ;
 - (ii) agua bidestilada;
 - (iii) solución de enjuague (HNO_3 al 10%).
3. Encender el generador de vapor y aumentar lentamente la presión, ajustando el tornillo situado sobre la bomba peristáltica, hasta que los líquidos comiencen a ser bombeados (no ajustarlo demasiado, ya que eso acortaría la vida de los tubos de la bomba).
4. Comprobar que no haya fugas.
5. Dejar que el sistema funcione durante unos 10 minutos para que se limpie. Si el sistema ha estado sin funcionar durante algún tiempo, desconectar el tubo negro de la celda de absorción de cuarzo (para evitar la contaminación de la celda).
6. Conectar el tubo entre el separador gas-líquido y la celda de absorción.

2.3.5. Calibración y medida de las muestras

En la parte superior de la pantalla del espectrómetro de absorción atómica se indica la solución que se va a medir (blanco; patrón 1, 2, etc.; recalcular la pendiente de calibración; muestra 1, 2,

etc.). Para escoger la solución que se analizará, pulsar SOLUTION TYPE. Comprobar siempre que la solución que se medirá es la que se ha indicado.

Para medir una solución, pulsar READ.

Llegado este punto, el espectrómetro de absorción atómica y el accesorio de generación de vapor deberían estar funcionando.

1. Ir a ANALYTICAL RESULTS.
2. Pulsar INSTRUMENT ZERO con la solución de enjuague (HNO₃ al 10%).
3. Medir la solución de enjuague como muestra: el resultado debería ser 0,000 ABS.
4. Medir el blanco o la curva de calibración como una muestra. El resultado también debería ser cercano a 0,000 ABS. Si no es así, volver a pulsar INSTRUMENT ZERO al aspirar la solución de enjuague.
5. Comprobar el valor de ABS de una solución patrón de Hg (medirla como muestra). Este valor indica la sensibilidad del instrumento y debe apuntarse en el registro.
6. Ir a CALIBRATION.
7. Medir el blanco de calibración y a continuación los patrones.
8. Después de medir cada solución patrón, aspirar la solución de enjuague durante aproximadamente un minuto.
9. Comprobar que la curva de calibración sea correcta.
10. Medir primero los blancos de reactivo y luego los materiales de referencia. Calcular la concentración del material de referencia en µg/g, y comprobar la exactitud del resultado antes de continuar.
11. Medir las muestras.
12. Después de medir cada muestra, pasar la solución de enjuague durante aproximadamente un minuto.
13. Medir un blanco y recalcular la pendiente de calibración cada cuatro o cinco muestras, según la estabilidad del instrumento.
14. Durante el análisis, medir el mismo material de referencia a intervalos regulares.

2.3.6. Procedimiento de apagado

1. Enjuagar todos los tubos con agua destilada durante aproximadamente 20 minutos (mantener el tubo empleado para la solución de SnCl₂ separado del resto).
2. Apagar el sistema de generación de vapor.
3. Liberar la presión de los tubos.
4. Cerrar el flujo de argón.
5. Apagar la impresora y el espectrómetro de absorción atómica.

2.3.7. Cálculos

$$[C] (mg/kg) = \frac{(Cd - Cb) \times V}{W}$$

[C]: concentración Hg total en la muestra seca (µg/g de peso seco)

Cd: concentración de Hg en la solución de muestra (µg/ml)

Cb: concentración media de Hg en los blancos de reactivo (µg/ml)

V: volumen de la dilución de las muestras digeridas (ml) = 57,5 ml

W: peso seco de la muestra (g).

3. Determinación de la concentración de Hg total mediante doble amalgamación con oro y detección por espectrometría de fluorescencia atómica de vapor frío

3.1. Principio del método

Tras la descomposición de las muestras en presencia de ácidos fuertes, el Hg^{2+} se reduce a mercurio volátil elemental (Hg^0) con un exceso de SnCl_2 . El mercurio elemental se concentra en una trampa de oro y se detecta tras su desorción a 600°C por fluorescencia atómica de vapor frío a $253,7\text{ nm}$.

3.2. Equipo, materiales y soluciones

3.2.1. Equipo

- Espectrómetro de fluorescencia atómica (Brook Rand) u otro equipo similar.

3.2.2. Materiales

- Matraces aforados de 100, 500 y 1.000 ml (clase A).
- Botellas de vidrio de 1 litro, previamente limpiadas según el procedimiento indicado para la limpieza de los objetos de vidrio.
- Borboteadores de teflón (60 ml) (500 ml para las muestras de agua), previamente limpiados según el procedimiento indicado para la limpieza de los objetos de teflón.
- Tubos de teflón, previamente limpiados según el procedimiento indicado para los objetos de teflón.
- Botellas de teflón de 125 ml y 1 litro, previamente limpiadas según el procedimiento indicado para la limpieza de los objetos de teflón.
- Lana de cuarzo limpiada a 500°C .
- Arena de oro.
- Columnas de cuarzo para las trampas de oro, previamente limpiadas según el procedimiento indicado para la limpieza de los objetos de vidrio.
- Columnas secadoras (tubo de teflón o de cuarzo relleno con cal sodada), previamente limpiadas según el procedimiento indicado para la limpieza de los objetos de vidrio o de teflón.
- Sistema de calentamiento de las trampas de oro (2 VARIAC, 6A y temporizador; alambre de Cr/Ni de 0,5 mm).
- Medidores de flujo.
- Integrador.
- Balanza de precisión.

3.2.3. Limpieza de del material de vidrio

Antes de usarlo, lavar cuidadosamente todo el material de laboratorio de vidrio tal y como se explica a continuación

- Dejar los recipientes de teflón y de vidrio en remojo toda la noche en una solución de detergente Micro-90 al 2%.
- Lavar exhaustivamente los recipientes, primero con agua del grifo y luego con agua bidestilada.
- Enjuagar con una solución de KMnO_4 al 0,5%.
- Enjuagar con agua hasta que el color de la solución de KMnO_4 no resulte visible.
- Llenar los recipientes con una solución de HCl al 1% y almacenar en un lugar libre de Hg.
- Vaciar los tubos justo antes de procesar las muestras y dejarlos secar a 60 °C en una campana de flujo.

Limpieza de los objetos de teflón

- Dejar los recipientes en remojo toda la noche en una solución jabonosa (solución de detergente Micro-90 al 2% en agua del grifo) en un contenedor de plástico.
- Lavarlos exhaustivamente, primero con agua del grifo y luego con agua bidestilada.
- Sumergir los recipientes en una solución de ácido nítrico concentrado al 50% (v/v) y calentar a 60°C durante dos días.
- Enjuagar exhaustivamente con agua bidestilada (al menos cuatro veces).
- Transferir los recipientes a una solución de HCl concentrado al 10% (v/v) a temperatura ambiente durante un día (como mínimo).
- Enjuagar exhaustivamente con agua bidestilada (al menos cuatro veces).
- Guardar los recipientes en bolsas de polietileno. Cuando sea posible, llenar los recipientes (principalmente los de teflón y de vidrio) con una solución de HCl al 1%.

Reactivos y sustancias químicas

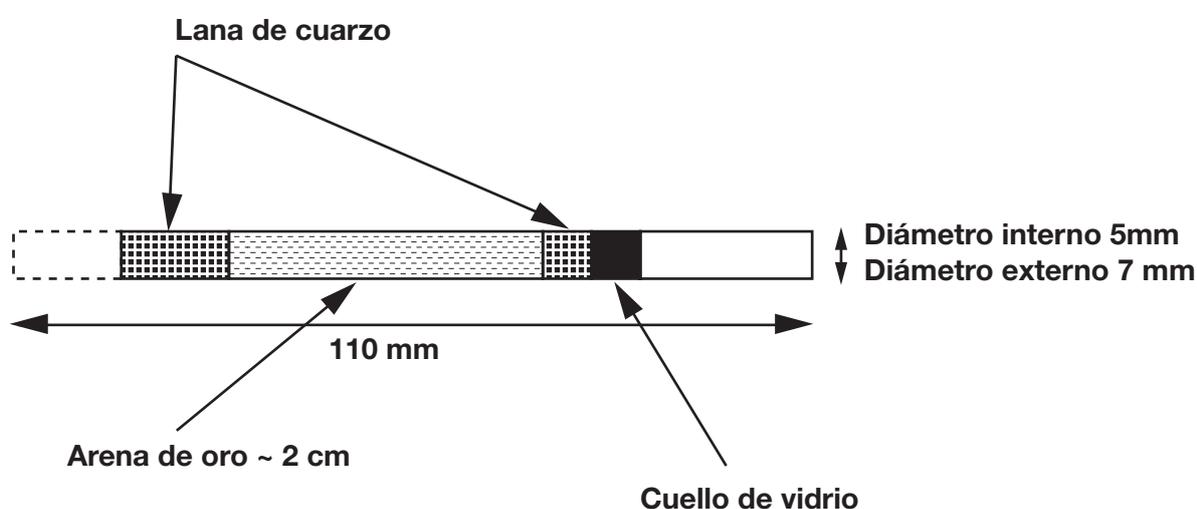
- SnCl_2 (calidad analítica)
- KBrO_3
- KBr
- SnCl_2 (calidad analítica, normal o bajo en Hg)
- HCl (al 30%)
- HNO_3 (al 65%)
- $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (calidad analítica, bajo en mercurio)
- Gránulos de cal sodada (calidad analítica)
- Agua bidestilada desionizada (>18 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$)
- Argón (libre de Hg).

3.2.4. Preparación de la trampa de oro (figura 1)

1. Introducir una porción pequeña de lana de cuarzo hasta el fondo de la parte más larga de la columna con ayuda de una pipeta de Pasteur.
2. Introducir unos 2 cm de arena de oro. Conviene pesar la arena que se coloca en la trampa para obtener una mejor reproducibilidad entre las trampas.
3. Insertar una porción más grande de lana de cuarzo con ayuda de una pipeta de Pasteur. Procurar preparar todas las trampas de la misma manera.
4. Limpiar la nueva trampa al menos cuatro veces antes de usarla (véase el procedimiento analítico).

Nota: al usar trampas nuevas, antes de iniciar el análisis de las muestras debe comprobarse la reproducibilidad de la respuesta del patrón con todas las trampas

Figura 1. Trampa de oro



3.2.5. Soluciones de reactivos

SnCl₂ al 20% p/v en HCl al 20% v/v (100 ml)

1. Introducir en un vaso de precipitado de vidrio limpio y con una espátula de plástico exactamente 20 g de SnCl₂ (el vaso y la espátula solo se usan para el SnCl₂).
2. Añadir 20 ml de HCl concentrado directamente al SnCl₂, y transferir todo el contenido a un matraz aforado de 100 ml. Mezclar y esperar a que el SnCl₂ se disuelva por completo.
3. Agregar agua bidestilada hasta la marca de 100 ml.
4. Si el SnCl₂ lleva tiempo almacenado, tal vez sea necesario calentar la solución sobre una placa calefactora para poder disolverlo completamente (no dejar que hierva).
5. Purgar la solución de SnCl₂ con nitrógeno durante dos horas, para obtener una solución libre de Hg.

Para oxidar las soluciones existen dos posibilidades:

K₂Cr₂O₇ al 10% (p/v) en agua bidestilada

1. Pesar 50 g de K₂Cr₂O₇ en un matraz aforado de vidrio limpio de 500 ml.
2. Añadir aproximadamente 250 ml de agua bidestilada y agitar hasta que el K₂Cr₂O₇ se disuelva por completo.
3. Enrasar hasta la marca con agua bidestilada.

Solución oxidante de BrCl

1. Pesar con exactitud 11 g de KBrO_3 y 15 g de KBr en una botella de vidrio limpia de 1 litro.
2. Añadir 200 ml de agua bidestilada.
3. Agregar cuidadosamente 800 ml de HCl concentrado; la dilución debe llevarse a cabo en una campana de gases bien ventilada para evitar la exposición a los gases tóxicos liberados durante la disolución de KBrO_3 .
4. Envolver la botella en papel de aluminio.

Estas dos soluciones pueden conservarse durante un período ilimitado si se almacena en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente, en un recipiente de teflón o una botella de vidrio cerrados herméticamente, en un lugar libre de Hg.

3.2.6. Soluciones patrón de mercurio

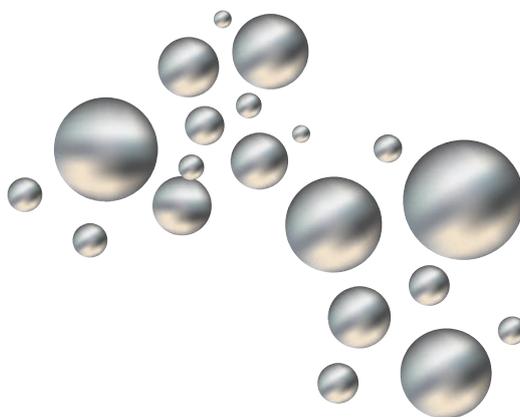
Solución patrón madre: 1 mg/ml de Hg en HNO_3 al 10%

1. Pesar exactamente 1,354 g de HgCl_2 en un matraz aforado de vidrio de 1 litro.
2. Añadir aproximadamente 500 ml de agua bidestilada.
3. Agregar 10 ml de HNO_3 concentrado (bajo en Hg).
4. Completar hasta enrasar con agua bidestilada.
5. Agitar bien hasta lograr una su completa disolución.
6. Transferir a una botella de teflón de 1 litro.
7. Cerrar bien con una llave dinamométrica y conservar en el refrigerador (4°C).

Solución patrón intermedia: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Hg en HNO_3 al 4%

1. Pesar 95 g de agua bidestilada en una botella de teflón de 125 ml.
2. Agregar 4 ml de HNO_3 concentrado (bajo en Hg).
3. Añadir 1 ml de solución de BrCl (o 2 ml de solución de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$).
4. Agregar 100 μl de la solución madre (1 mg/ml de Hg).
5. Agitar bien.

Si se necesita una solución más diluida, diluir la solución patrón intermedia según el procedimiento indicado. Las botellas de soluciones patrón deben cerrarse herméticamente con una llave y conservarse en el refrigerador (4°C).



3.3. Procedimiento analítico

1. Preparar las muestras tal como se ha descrito anteriormente.
2. Las trampas de oro deben limpiarse antes de su uso, calentándolas a 600°C sin que estén conectadas al espectrómetro de absorción atómica. Después debe comprobarse que no quede Hg residual. Para ello, volver a calentarlas y medir el Hg liberado.
3. Limpiar el borboteador (una o varias veces si el sistema no se ha utilizado durante algún tiempo) según el procedimiento que se indica más adelante.
4. Medir el blanco contenido en el borboteador siguiendo el procedimiento indicado más adelante y verificar que el sistema no se ha contaminado. Si los valores del blanco son demasiado altos, seguir limpiando el sistema hasta que sean correctos y estables.
5. Calibrar el sistema según el procedimiento que se indica más adelante, en el apartado “Curva de calibración”. Esta calibración debe efectuarse al menos dos veces durante el día.
6. Medir los blancos de reactivo y las soluciones de material de referencia (digeridos al mismo tiempo que las muestras) siguiendo el procedimiento que se indica más adelante (“Análisis del blanco de reactivo” y “Análisis de la muestra”). Antes de comenzar a analizar la muestra, verificar la ausencia de contaminación por Hg, así como la exactitud de las medidas.
7. Comenzar a medir la muestra como se indica a continuación (“Análisis de la muestra”). Durante la medida de los controles de calidad, tanto el material de referencia como los blancos de reactivo deben medirse al menos dos veces para cada curva de calibración.

3.3.1. Limpieza del borboteador

1. Enjuagar y llenar el borboteador (3/4) con agua bidestilada.
2. Añadir 500 µl de la solución de SnCl₂.
3. Purgar con argón durante 15 minutos.

3.3.2. Blanco en el borboteador

1. Enjuagar y llenar el borboteador (3/4) con agua bidestilada.
2. Añadir 500 µl de la solución de SnCl₂.
3. Fijar la trampa de oro y purgar con argón durante 15 minutos.
4. Analizar la trampa.

3.3.3. Curva de calibración

1. Enjuagar y llenar el borboteador (3/4) con agua bidestilada.
2. Añadir solución patrón (50 - 150 µL de solución madre de 1 ng/ml, equivalente a 50 - 150 pg de Hg).
3. Añadir 500 µl de la solución de SnCl₂.
4. Fijar la trampa de oro y purgar con argón durante 15 minutos.
5. Extraer la trampa y analizarla.

La curva de calibración debe prepararse en el rango de concentraciones de la muestra. Si es necesario, pueden usarse patrones más concentrados que los indicados.

3.3.4. Análisis del blanco de reactivo

1. Enjuagar y llenar el borboteador con agua bidestilada (la cantidad depende del volumen del blanco de reactivo que se añadirá).
2. Añadir la solución blanco (blanco de reactivo). El volumen debe ser al menos igual al volumen de muestra que se analizará (es decir, si para el análisis se necesitan 10 ml de muestra, deben analizarse al menos 10 ml de blanco). Si el nivel de Hg en el blanco de reactivo es muy bajo, en el análisis pueden emplearse volúmenes mayores de la blanco.
3. Añadir 500 μl de la solución de SnCl_2 .
4. Fijar la trampa de oro y purgar con argón durante 15 minutos (figura 2).
5. Extraer la trampa de oro y analizarla (figura 3).

Figura 2. Sistema de borboteo para el análisis de la concentración de mercurio total

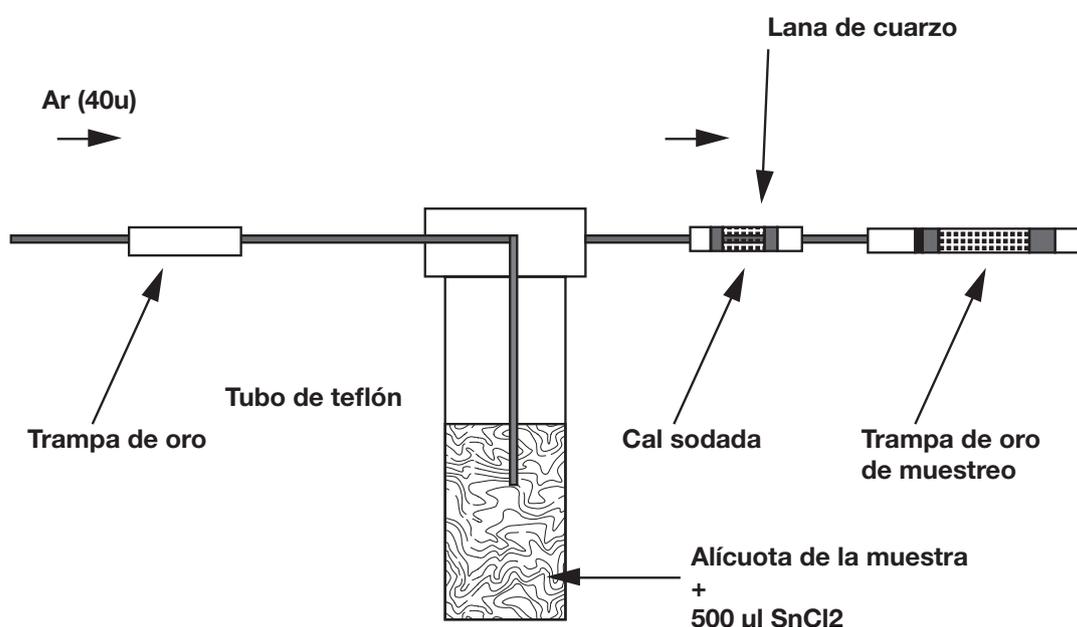
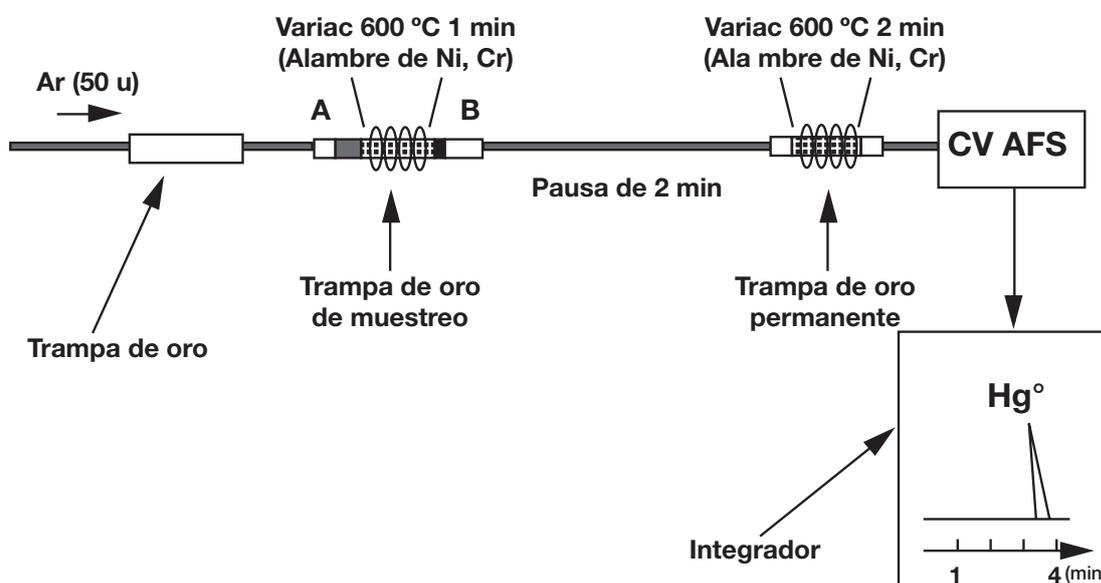


Figura 3. Sistema analítico



3.3.6. Análisis mediante doble amalgamación (figura 3)

1. Colocar la trampa de oro de muestreo en el sistema de medida (analítico) en un flujo de argón.
2. Calentar la trampa de oro de muestreo a 600 °C durante un minuto para liberar el Hg.
3. Esperar dos minutos a que el mercurio se amalgame en la trampa de oro permanente.
4. Calentar la trampa de oro permanente a 600 °C durante dos minutos para liberar el mercurio.
5. Detectar el Hg mediante espectrometría de fluorescencia atómica de vapor frío (CVAFS).

3.4. Cálculos

Trazar la curva de calibración mediante:

X: pg de Hg²⁺ en el patrón añadido;

Y: respuesta del integrador (área pico en unidades arbitrarias).

Calcular los parámetros de la curva de calibración mediante regresión lineal de todos los puntos de los patrones (al menos tres patrones) y la media de los blancos del borboteador (unidad) para el valor cero:

$$y = b + ax$$

Blanco de reactivo:

$$[B](pg/ml) = \frac{(Ab - b)}{a \times V}$$

[B]: concentración de metilmercurio en el blanco de reactivo (pg/ml)

Ab: respuesta obtenida para una alícuota del blanco de reactivo analizado (área pico en unidades arbitrarias)

V: volumen del blanco de reactivo analizado (ml)

Muestras:

$$[S](pg/g) = \frac{\left[\frac{As - b}{a \times Va} \right] - [B]}{W} \times Vs$$

[S]: concentración de Hg en la muestra seca (pg/g de peso seco)

As: respuesta obtenida para la alícuota de la muestra analizada (área pico en unidades arbitrarias)

Va: alícuota de la muestra analizada (ml)

Vs: volumen total de la muestra (ml)

W: peso seco de la muestra (g)

[B]: concentración de metilmercurio en el blanco de reactivo (pg/ml).

9789240002845



9

789240

002845