



Control de calidad de las
mediciones; precisión y exactitud
2007

T.M Alejandra Espinosa
Curso: Bioquímica aplicada

Objetivos de la clase

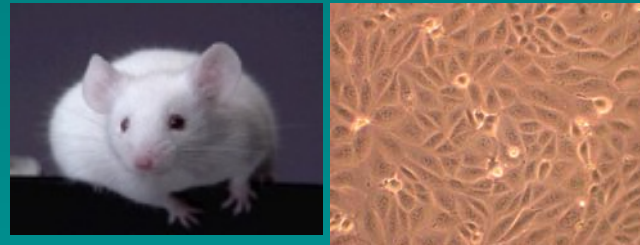
- Recordar el método científico
- Reconocer los tipos de errores asociados a la mediciones y como corregirlos
- Conocer herramientas estadísticas para validar y estandarizar las técnicas de medición en el laboratorio

Método científico

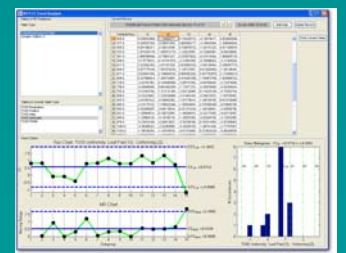
Método científico



Variable a estudiar



Técnica
Pcr, wb, actividad enzimática

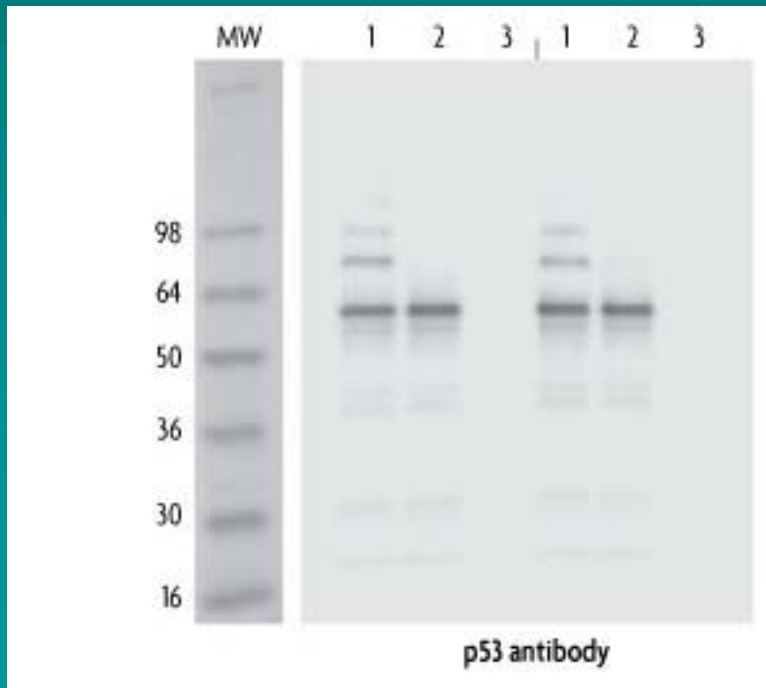


Diseño experimental:

Es necesario realizar un diseño de experimentos controlados, evaluar una variable a la vez, y mantener el resto de las condiciones experimentales controladas.

Elementos de un ensayo de medición

- Blanco: Elimina las interferencias no específicas del ensayo
- Estándar: Es el patrón de comparación de la señal medida
- Control positivo: Controla la sensibilidad del ensayo
- Control negativo: Controla la especificidad del ensayo



Ej. Western blot para detectar P53


MW: estándar de peso molecular

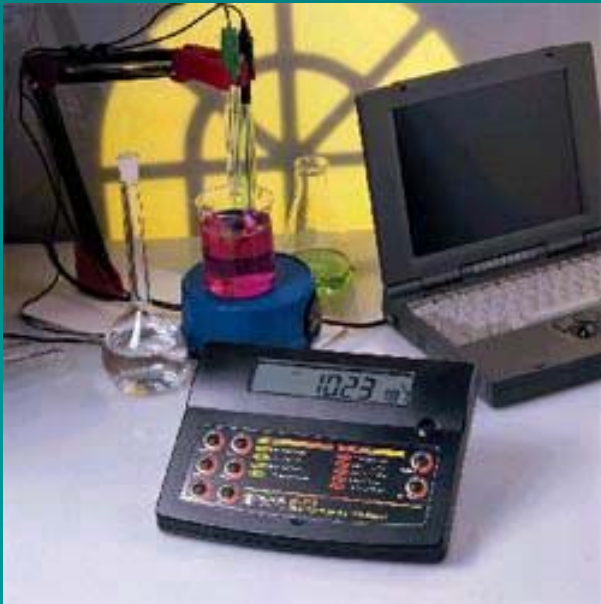
Carril 1: control positivo

Carril 2: muestra positiva

Carril 3: control negativo

La variabilidad en las investigaciones biomédicas

- Limitaciones de los métodos usados 
- Personal no adiestrado
- Deficiencias en el mantenimiento, calibración y precisión de los instrumentos de medición.



Necesitamos medir proteínas de muestras que contienen entre 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. ¿qué método elegimos?

Método 1

Proteínas Totales

AA

Método colorimétrico para la determinación de proteínas totales en suero

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes en MUESTRA.

Puede usarse plasma como muestra, pero el resultado de la proteinemia estará incrementado en 0,2 g/dl debido a la presencia de fibrinógeno, que no está considerado dentro de la definición de Proteínas Totales.

PERFORMANCE

a) Reproducibilidad: procesando replicados de las mismas muestras en distintos días se obtuvieron los siguientes resultados:

Nivel	D.S.	C.V.
4,6 g/dl	$\pm 0,022$ g/dl	0,49 %
5,8 g/dl	$\pm 0,023$ g/dl	0,56 %
7,0 g/dl	$\pm 0,028$ g/dl	0,39 %

b) Recuperación: agregando cantidades conocidas de proteínas a distintas muestras se obtuvo una recuperación de 96 a 103 %.

c) Límite de detección: depende del fotómetro empleado y de la longitud de onda. De acuerdo con la sensibilidad requerida para un ΔA mínimo de 0,001, el menor cambio de concentración detectable será de 0,01 g/dl.

d) Linealidad: la reacción es lineal hasta 17 g/dl.

Si el instrumento usado en la lectura tuviese baja sensibilidad fotocolorimétrica, puede emplearse 20 μl de muestra con 1,5 ml

Método 2

PIERCE The Protein People

PRODUCTS TECHNICAL RESOURCES LITERATURE PROTEIN DISCOVERY PATHWAYSSM MAPS ABOUT Part of Thermo Fisher Scientific

YOU ARE HERE: Product

DOCUMENT CENTER HIDE

- > Certificate of Analysis
- > Instruction Books
- > MSDS
- > Print This Page
- > Email This Page
- > Request A Catalog

USER PROFILE HIDE

Email Address:

Password:

LOG IN

> I Forgot My Password

Coomassie Plus - The Better Bradford Assay

As fast as the original Coomassie Assay, with increased accuracy...the high performance Bradford reagent.

Choose the fastest and simplest protein assay reagent available! The Coomassie Plus Assay Reagent is ready to use – no tedious working reagent preparation is necessary. Simply add the reagent to the equal volumes of samples and standards, mix and then measure the absorbance at 595 nm. The assay costs only pennies per sample and may be performed in either test tube or microplate format. The Coomassie Plus Assay Reagent formulation provides increased linearity of response and only half the expected protein:protein variation of other commercial Bradford assay formulations.

Highlights:

- Detects protein concentrations from 1-1,500 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- Ready-to-use dye-binding reagent formulation
- Fast (almost immediate) color development read at 595 nm
- Compatible with reducing sugars, reducing substances and thiols
- Refrigerated reagent is stable for 2 years
- Superior linear response over the range of 125-1,500 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- Adaptable to microplates
- Micro protocol useful for protein concentrations from 1-25 $\mu\text{g}/\text{ml}$

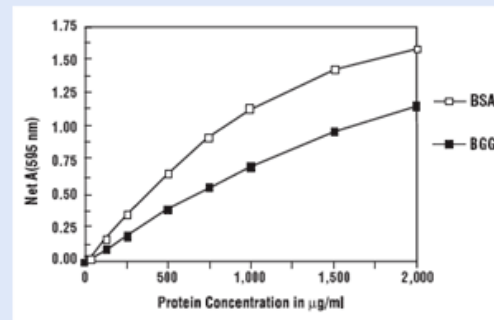


Figure 1. Typical color response curves for BSA and BGG using the Coomassie Plus - The Better Bradford Assay Reagent.

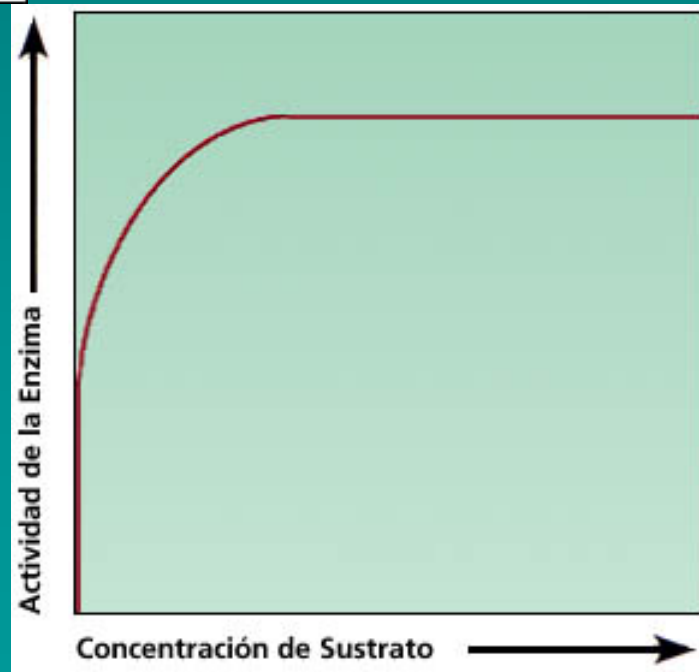
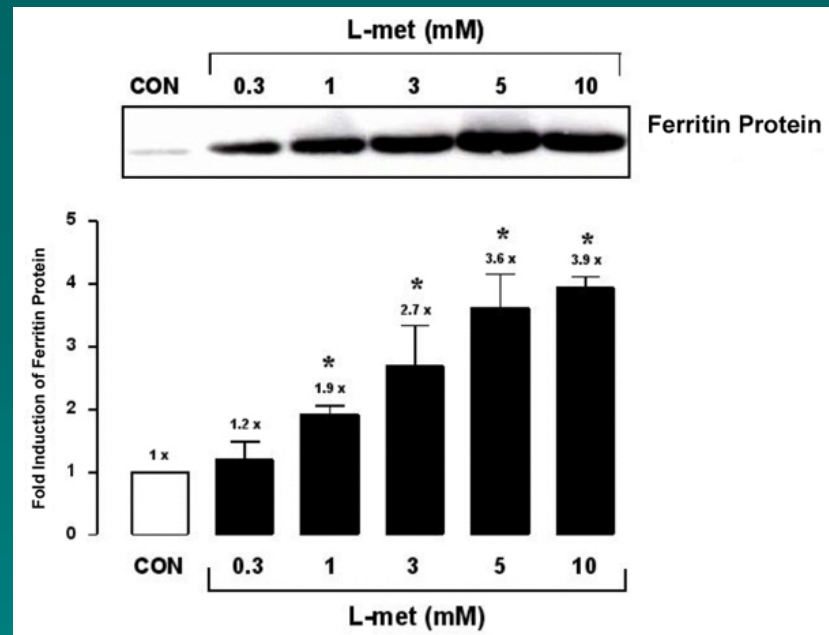
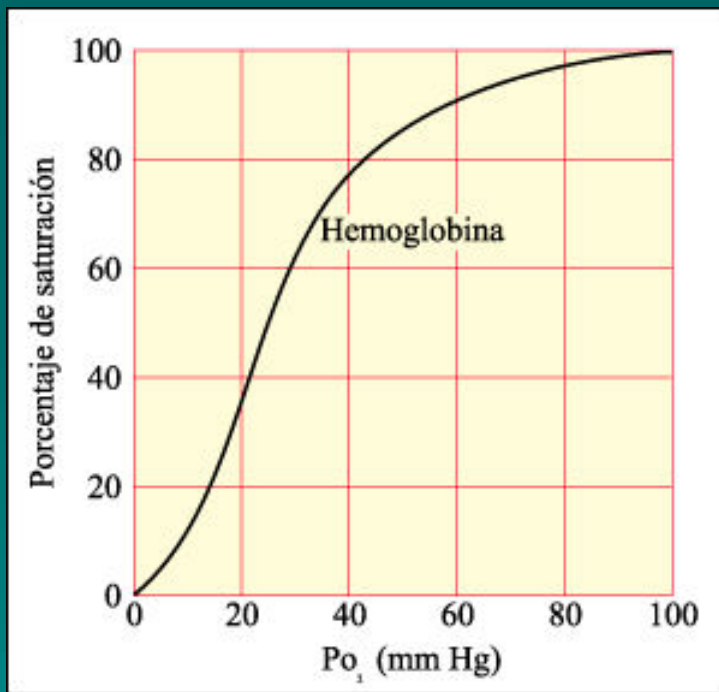
Análisis de las curvas dosis respuesta

- Existe una relación matemática entre la concentración de una solución y la señal medida, esta relación debe ser determinada empíricamente.
- Toda medición esta sujeta a errores instrumentales, los que pueden ser :

Aleatorios

Sistemáticos

- Una curva dosis respuesta requiere como premisa que una de las variables esté extenta de errores y la otra (respuesta) este sometida a fluctuaciones solo de tipo aleatorio.



Concepto de error

Errores sistemáticos

- ✓ Son aquellos que influyen las mediciones en la misma dirección y en la misma magnitud. Son errores originados por causas identificables y corregibles.
- ✓ Introducen un error constante
- ✓ Pueden ser detectados y eliminados

Errores aleatorios

- Los errores aleatorios son debidos al azar, no pueden ser controlados, son indeterminados.
- El sentido y la amplitud de estos errores no son reproducibles de una medida a la otra
- La habilidad para detectar estos errores mediante técnicas de control de calidad es limitada , pues por su naturaleza se producen al azar y en forma esporádica. Requieren de análisis estadísticos para su resolución.

ESTRATEGIAS PARA REDUCIR EL ERROR ALEATORIO

Estandarizar los métodos de medición en el manual de operaciones

Adiestramiento y acreditación del observador

Refinamiento del instrumento de medida

Automatización del instrumento

Repetición de la medición

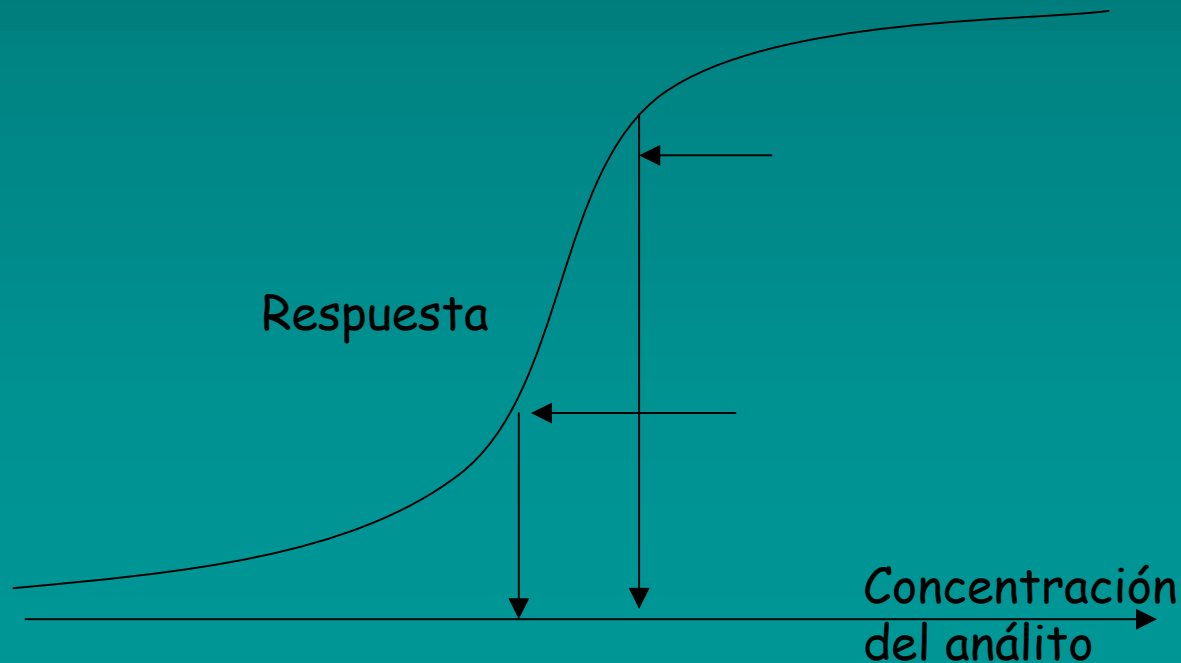
VALIDACIÓN DE UN MÉTODO

Criterios de Validación de un Método Analítico

- Conocer los errores asociados a la medición
- Linealidad
- Límite de
 - Detección
 - Cuantificación
- Especificidad
- Sensibilidad
- Exactitud
- Precisión
 - Repetibilidad
 - Reproducibilidad

Linealidad

Es la habilidad de un sistema o método analítico para asegurar que los resultados obtenidos directamente o mediante una transformación, son proporcionales a la concentración de la sustancia, dentro de un intervalo determinado



Límite de detección

Es la concentración más baja de analito que puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, en las condiciones experimentales establecidas para el método. Se determina la señal o ruido.

Límite de cuantificación

Es la menor concentración de una sustancia en una muestra que puede ser cuantificada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones establecidas.

Valor de tendencia central y la dispersión son índices de variabilidad

- La medida de tendencia central es un valor alrededor del cual una serie de resultados tiende a agruparse, esta dado por el promedio de los resultados.
- La desviación estándar, el coeficiente de variación y el error estándar, son medida de dispersión.

Regresión lineal en el análisis de las curvas de calibración

Utilidad: Lograr obtener la ecuación de la recta que logra la mejor asociación entre las mediciones que forman parte de la curva de calibración

Y: señal medida

$$Y=bX+a$$

X: variable independiente

b: Coeficiente linear de la recta (pendiente)

a: Coeficiente angular de la recta

R²: Coeficientes de regresión

Coeficiente de regresión: Parámetro que permite una estimación de la calidad de la curva obtenida, mientras más se acerque a 1, mayor es la precisión del conjunto de puntos experimentales y menor la incertidumbre de los coeficientes de regresión estimados.

Intervalo de confianza

$$IC = \bar{x} \pm t \frac{s}{\sqrt{n}}$$

$$SE = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

\bar{x} =promedio

s = desviación estándar

t =valor de t de student

n =tamaño de la muestra

Supongamos un riesgo del 5% (o un nivel de confianza del 95%), $\alpha=0.05$, y grados de libertad $v=10$. Utilizaremos $\alpha/2$ ya que dejamos el mismo espacio correspondiente a la región de rechazo por ambos lados.

Valores *t* de Student y probabilidad *P* asociada en función de los grados de libertad *gl*.

gl	P (de una cola)									
	0.4	0.25	0.1	0.05	0.025	0.01	0.005	0.0025	0.001	0.0005
2	0.289	0.816	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	14.089	22.326	31.596
3	0.277	0.765	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	7.453	10.215	12.924
4	0.271	0.741	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	5.598	7.173	8.610
5	0.267	0.727	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	4.773	5.893	6.869
6	0.265	0.718	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	4.317	5.208	5.959
7	0.263	0.711	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.029	4.785	5.408
8	0.262	0.706	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	3.833	4.501	5.041
9	0.261	0.703	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	3.690	4.297	4.781
10	0.260	0.700	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	3.581	4.144	4.587
11	0.260	0.697	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	3.497	4.025	4.437
12	0.259	0.695	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.428	3.930	4.318
13	0.259	0.694	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.372	3.852	4.221
14	0.258	0.692	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.326	3.787	4.140
15	0.258	0.691	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.286	3.733	4.073
16	0.258	0.690	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.252	3.686	4.015
17	0.257	0.689	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.222	3.646	3.965
18	0.257	0.688	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.197	3.610	3.922
19	0.257	0.688	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.174	3.579	3.883
20	0.257	0.687	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.153	3.552	3.850

Especificidad

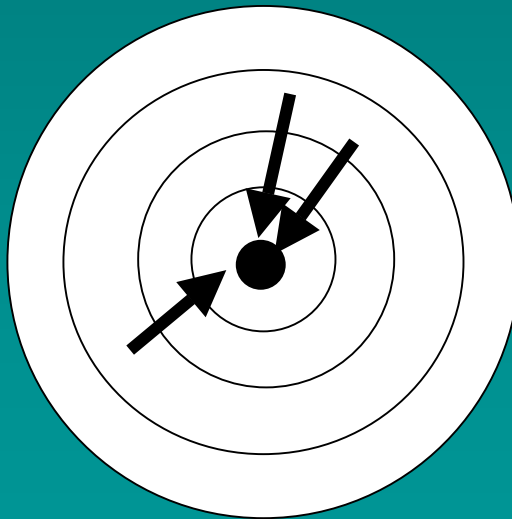
Capacidad de un procedimiento analítico para determinar solamente el analito que se desea medir. Algunos métodos son inexactos o entregan resultados falsamente elevados debido a que existen otros componentes distintos al analito de la muestra que se está analizando.

Repetibilidad y reproducibilidad

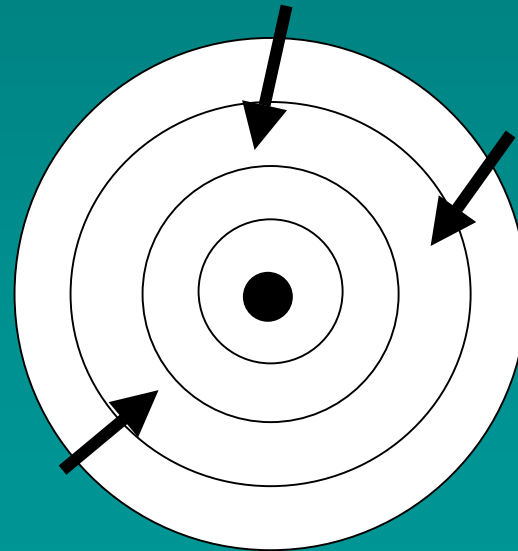
- Repetibilidad: Es la precisión del método expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones. (analista, método, materiales, equipo, etc.)
- Reproducibilidad: Es la precisión del método expresada como la concordancia entre determinaciones independientes, realizadas bajo condiciones diferentes. (diferentes analistas, materiales, equipos, laboratorios, etc.)

Exactitud

- La exactitud de un método es la concordancia del valor medio calculado de una magnitud con el valor verdadero



Exactitud



Inexactitud

Exactitud

(BC) es una estimación de la inexactitud de un resultado, ello se debe a que utiliza un patrón primario o un valor asignado (generalmente aferido a un estándar internacional)

$$BC = \frac{\bar{x} - X}{X} 100$$

$$CE = 100\% - BC$$

Precisión

La desviación estándar relativa corresponde al coeficiente de variación

$$CV=100 \times \frac{S}{\bar{X}}$$

- La precisión es un concepto que se relaciona con la repetibilidad de una medición.
- Para mantener la precisión es necesario:
 - Usar el mismo lote de reactivos
 - Mantener los calibradores
 - Mantener los mismos instrumentos y analista

Precisión

Varianza

$$s^2 = \frac{\sum (xi - \bar{x})^2}{n-1}$$

Desviación estándar

$$s = \sqrt{\frac{\sum (xi - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Desviación estándar: Es un reflejo del grado de dispersión de las mediciones

n-1= grados de libertad

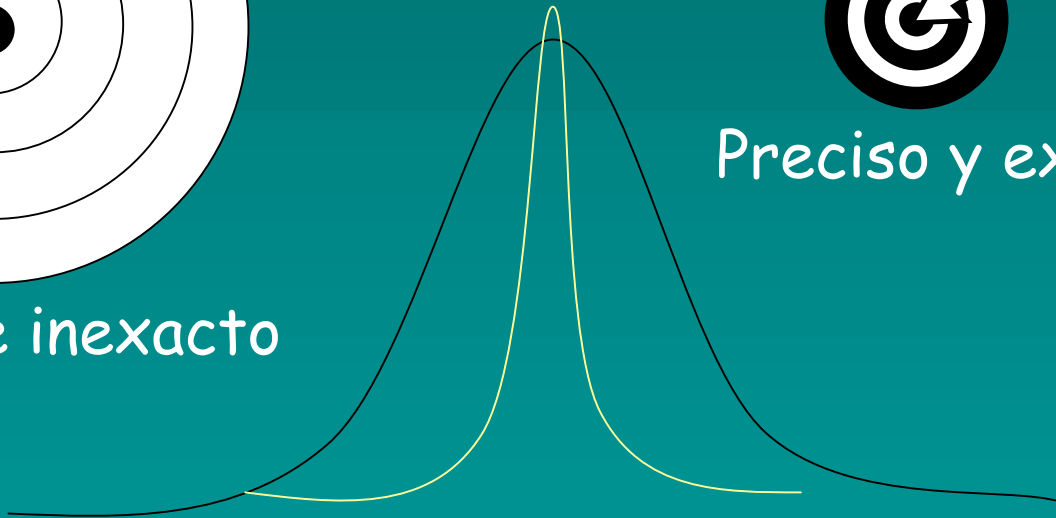
Precisión



Preciso e inexacto



Preciso y exacto

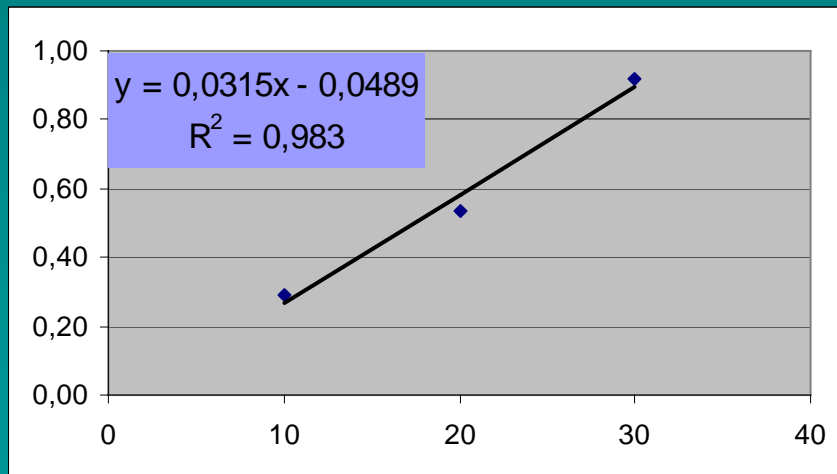


Ejercicio

Concentración	Abs1	Abs2	Abs3
10	0,25	0,30	0,32
20	0,45	0,55	0,60
30	0,90	0,98	0,88

- Determine los parámetros de la regresión lineal
- Calcule el coeficiente de variación

concentracion g/L	Abs1	Abs2	Abs3	prom
10	0,25	0,3	0,32	0,29
20	0,45	0,55	0,6	0,53
30	0,9	0,98	0,88	0,92
10	0,29			
20	0,53			
30	0,92			



fin