



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES
ORGANISMO DE INVESTIGACION JUDICIAL (OIJ)
PODER JUDICIAL, COSTA RICA

**DETERMINACIÓN DE CARBOXIHEMOGLOBINA POR
REDUCCIÓN CON DITIONITO Y ESPECTROFOTOMETRÍA**

PROCEDIMIENTO DE
OPERACIÓN NORMADO
ESPECIFICO

P-DCF-ECT-TOX-29

VERSION: 04

Rige desde: 26/10/2022

PAGINA:1 de 25

Elaborado o modificado por:

Dr. Diego Arias Alfaro
Jefe, Sección Toxicología

Dr. Marco Martínez Esquivel
Perito, Sección de Toxicología

Revisado por Líder Técnico:

Dr. Marco Martínez Esquivel
Líder Técnico de Sección / Unidad de
Trámite Rápido

Visto Bueno Encargado de Calidad:

Dr. Marco Martínez Esquivel
Encargado de Calidad de la Sección de Toxicología

Aprobado por:

Dr. Diego Arias Alfaro
Jefe, Sección de Toxicología

CONTROL DE CAMBIOS A LA DOCUMENTACIÓN

Versión	Fecha de Aprobación	Fecha de Revisión	Descripción del Cambio	SCD	Solicitado por
01	16/10/2019	14/05/2021	Versión Inicial del Procedimiento	026-2019	DAA
02	14/05/2021	12/11/2021	Inclusión de datos de validación, modificación de redacción e inclusión de preparación de controles en anexos	009-2021	DAA
03	12/11/2021	26/10/2022	Inclusión de anexo con ejemplo de estimación de incertidumbre y la referencia al informe de estimación de incertidumbre	017-2021	DAA
04	26/10/2022		Inclusión de verificación de la rotulación en el proceso de análisis y confirmación de resultados positivos.	018-2022	DAA



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES
ORGANISMO DE INVESTIGACION JUDICIAL (OIJ)
PODER JUDICIAL, COSTA RICA

**DETERMINACIÓN DE CARBOXIHEMOGLOBINA POR
REDUCCIÓN CON DITIONITO Y ESPECTROFOTOMETRÍA**

PROCEDIMIENTO DE
OPERACIÓN NORMADO
ESPECIFICO

P-DCF-ECT-TOX-29

VERSION: 04

Rige desde: 26/10/2022

PAGINA:2 de 25

**ESTE PROCEDIMIENTO ES UN DOCUMENTO CONFIDENCIAL
PARA USO INTERNO DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES
SE PROHÍBE CUALQUIER REPRODUCCIÓN QUE NO SEA PARA ESTE FIN**

La versión oficial digital es la que se mantiene en la ubicación que la Unidad de Gestión de Calidad defina. La versión oficial impresa es la que se encuentra en la Unidad de Gestión de Calidad. Cualquier otro documento impreso o digital será considerado como copia no controlada

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 04	PAGINA: 3 de 25
DETERMINACIÓN DE CARBOXIHEMOGLOBINA POR REDUCCIÓN CON DITIONITO Y ESPECTROFOTOMETRÍA		P-DCF-ECT-TOX-29

1 Objetivo:

Determinar el porcentaje de carboxihemoglobina en muestras biológicas para relacionarla con la exposición a monóxido de carbono.

2 Alcance:

Este procedimiento permite determinar el porcentaje de carboxihemoglobina en muestras de sangre, ya sea sangre periférica o sangre obtenida a partir de muestras de tejido. Para ello se realiza una reducción con ditionito y una lectura espectrofotométrica.

Para la determinación se requiere que la sangre no esté coagulada.

La metodología presenta los siguientes parámetros de validación (referencia 3.7):

Nombre del parámetro de validación	Valor obtenido del parámetro	Criterio de aceptación y rechazo	Justificación (indique de donde se toma el criterio, ejemplo referencia bibliográfica)
Modelo de calibración	Se acepta un ámbito de trabajo de 0 a 100% de COHb, utilizando la curva de regresión lineal simple con los datos originales de Tietz. Obteniéndose valores de coeficiente de correlación mayores a 0,999.	Ámbito de trabajo entre 0 a 100% de COHb (Modelo lineal con coeficiente de correlación " r " > 0,99)	ANSI/ASB Standard 036, First Edition 2019, Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. Martínez, M.A. Criterios cuantitativos en toxicología forense. Rev Esp Med Legal. 2014; 40(1): 30-38.
Límite de detección y cuantificación	Los niveles de variación en los datos del valor de 0% de COHb son menores a 1%. El límite de detección estimado con los datos de las curvas de calibración es de 3,3% de COHb. Se evaluó el sesgo y la variabilidad de una muestra de sangre con un valor de COHb de 6,7% obteniéndose un sesgo% de 4,5% y un CV% de 7,2%.	Variabilidad menor al 5% de la relación de absorbancia (541/555 nm) del nivel de 0% de COHb con respecto al método original de Tietz.	ANSI/ASB Standard 036, First Edition 2019, Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. Tietz N W, Fiereck E. 1973. The Spectrometric Measurement of Carboxyhemoglobin. Ann Clin Lab Sci vol. 3 no. 1 36-42.
Veracidad	Los valores calculados de pruebas de competencia con las curvas de calibración histórica presentaron sesgos menores a $\pm 10\%$ y con los datos de Tietz se obtuvieron valores de sesgo menores a $\pm 5\%$.	Sesgo% menor al 20%	ANSI/ASB Standard 036, First Edition 2019, Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. Martínez, M.A. Criterios cuantitativos en toxicología forense. Rev Esp Med Legal. 2014; 40(1): 30-38.
Precisión	En las pruebas de competencia: Nivel menor a 10% de COHb: CV%: 7,2%. Niveles mayores a 10% de COHb: CV% entre 0,6 a 3,3 % En el control de 50% de COHb con la curva de calibración de Tietz: Variación interdía CV%: 3,8%. Variación intradía: CV% entre 0,6 a 7,2 % y un valor medio de CV% de 2,3%.	CV% menor al 20%	ANSI/ASB Standard 036, First Edition 2019, Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. Martínez, M.A. Criterios cuantitativos en toxicología forense. Rev Esp Med Legal. 2014; 40(1): 30-38.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 04	PAGINA: 4 de 25
DETERMINACIÓN DE CARBOXIHEMOGLOBINA POR REDUCCIÓN CON DITIONITO Y ESPECTROFOTOMETRÍA		P-DCF-ECT-TOX-29

Estabilidad	<p>El control preparado de 50% de COHb almacenado en refrigeración logró mantenerse estable por 6 meses con variaciones menores a 10%.</p> <p>Los valores calculados de pruebas de competencia con las curvas de calibración histórica presentaron sesgos menores a $\pm 10\%$ y con los datos de Tietz se obtuvieron valores de sesgo $\pm 5\%$, en un periodo de cuatro años.</p> <p>La diferencia de la relación de absorbancia (541/555nm) del nivel de 0% de COHb con respecto al método original de Tietz fue de 0,61% y del nivel de 100% fue de 1,7%.</p>	<p>Periodo de tiempo que el control de 50% de COHb presente una variabilidad menor al 20% del valor preparado.</p> <p>Periodo de tiempo que el sesgo% de las pruebas de competencia sean menores al 20% con la curva de calibración promedio.</p> <p>Variabilidad menor al 5% de la relación de absorbancia (541/555 nm) del nivel de 0 y 100 % de COHb con respecto al método original de Tietz. Pendiente estable en</p>	<p>ANSI/ASB Standard 036, First Edition 2019, Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology.</p> <p>Martínez, M.A. Criterios cuantitativos en toxicología forense. <i>Rev Esp Med Legal</i>. 2014; 40(1): 30-38.</p> <p>Tietz N W, Fiereck E. 1973. The Spectrometric Measurement of Carboxyhemoglobin. <i>Ann Clin Lab Sci</i> vol. 3 no. 1 36-42.</p>
-------------	---	--	---

3 Referencias:

- 3.1** ANSI/ASB Standard 036, First Edition 2019, Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology.
- 3.2** Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX). 2013. Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. *J Anal Toxicol*, 37:452-474.
- 3.3** Tietz N W, Fiereck E. 1973. The Spectrometric Measurement of Carboxyhemoglobin. *Ann Clin Lab Sci* vol. 3 no. 1 36-42.
- 3.4** Validación y estimación de incertidumbre de la determinación carboxihemoglobina por reducción con ditionito y espectrofotometría. Informes 003-TOX-VAL-2020 y 003-TOX-INC-2020.

4 Equipos y Materiales:

Agitador de tubos de ensayo por inversión (rotatorio).

Balanza analítica, rango 0,00001 a 30 gramos ($\pm 0,00001$ gramos) y de 30 a 120 gramos ($\pm 0,0001$ gramos), similar o superior.

Balones aforados de 25 mL y 1000mL

Base de datos "Manejo de solicitudes y RAS", versión actualizada, elaborada por el Dr. Marco Antonio Martínez Esquivel.

Beaker de vidrio de 50, 100 o 150 mL.

Bitácora de control del equipo Espectrofotómetro ultravioleta visible (UV-VIS) Varian Cary 50 BIO.

Botella de vidrio ámbar de 1 L.

Cabina de Bioseguridad Clase 2-B2.

Cámara de Bioseguridad tipo I.

Capilla de extracción de gases.

Cubetas de plástico de 3 mL de 10 x 10 mm de paso de luz nuevas o lavadas.

P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01
Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 04	PAGINA: 5 de 25
DETERMINACIÓN DE CARBOXIHEMOGLOBINA POR REDUCCIÓN CON DITIONITO Y ESPECTROFOTOMETRÍA		P-DCF-ECT-TOX-29

Desecador.

Dilutor Microlab 500 o 600 Series Hamilton, con jeringas de dilución y con jeringas de muestreo con rango de 10 uL a 50000 uL, exactitud $\pm 3,0\%$, o similar.

Espectrofotómetro ultravioleta visible (UV-VIS) Varian Cary 50 BIO, para cubeta de 1 cm de paso de luz de sistema óptico de doble haz interno o similar.

Etiquetas.

Formulario "Reporte de carboxihemoglobina", versión vigente.

Gabacha.

Gradilla para cubetas de 10 x 10 mm.

Guantes desechables.

Hoja de cálculo de carboxihemoglobina, versión vigente

Horno de laboratorio, rango 20-240° C ($\pm 10^\circ\text{C}$).

Lavadora automática de cristalería.

Lentes de seguridad.

Mascarilla N95 o similar.

Micropipeta automática de 10 μL a 100 μL con puntas nuevas

Microtubos plásticos tipo eppendorf de 0,5 mL o similar.

Pipeta automática de 1 a 5 mL con puntas nuevas o lavadas.

Pizetas plásticas de 250ml y 500 mL o similar.

Probeta de 25 mL, 100 mL y 1000 mL.

Recipiente plástico para desecho de 0,5 a 2 L.

Sistema de válvulas para burbujeo de gases.

Tubos de ensayo de plástico 13 x 100 mm ó 10 x 75 mm con tapa nuevos o lavados.

Tubos de extracción de sangre al vacío de 10 mL con oxalato y fluoruro de sodio (tapón gris) desechables.

Tubos plásticos cónicos de 15 mL tapa rosca nuevos.

Nota 1: Lave la cristalería y el material plástico según lo especificado en el PON para el manejo general de casos en la Sección de Toxicología Forense.

5 Reactivos y Materiales de Referencia:

Agua desionizada.

Alicuotas de 10 mg de ditionito de sodio (Ver Anexo No. 1).

Disolución de cloro concentrada, se adquiere comercialmente.

Disolución de hidróxido de amonio 0,12 M (Ver Anexo No. 1)

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 04	PAGINA: 6 de 25
DETERMINACIÓN DE CARBOXIHEMOGLOBINA POR REDUCCIÓN CON DITIONITO Y ESPECTROFOTOMETRÍA	P-DCF-ECT-TOX-29	

Disolución de hipoclorito de sodio al 0,5 % (Ver Anexo No. 1).

Ditionito de sodio de pureza >85%.

Etanol p.a. (70-90%).

Gas monóxido de carbono en cilindro.

Gas oxígeno en cilindro.

Hidróxido de amonio 28 a 30% p.a. (NH₄OH).

Jabón alcalino para lavado de cristalería (Alconox o similar).

Líquido detector de fugas Snoop o similar.

Sangre control con concentración aproximada al 50% de COHb. (Ver Anexo No. 1)

Sangre para control normal de carboxihemoglobina de persona no expuesta. (Ver Anexo No. 1)

6 Condiciones Ambientales:

No.	Condición ambiental	Valor mínimo	Valor máximo	Otras características
1	Temperatura durante la saturación de patrones con monóxido y oxígeno. Preparación del control de 50% COHb.	No es crítico para el proceso	No es crítico para el proceso	Cabina de Bioseguridad Clase 2-B2 o Capilla de extracción de gases con mascarilla N95 o similar.
2	Toma de las alícuotas de las muestras.	No es crítico para el proceso	No es crítico para el proceso	Cabina de Bioseguridad Clase 2-B2 o Cámara de Bioseguridad tipo I o Capilla de extracción de gases con mascarilla N95 o similar.
3	Análisis en el espectrofotómetro ultravioleta-visible	No es crítico para el proceso	30 °C	Cuarto instrumental anexo. Estos parámetros no requieren monitoreo continuo debido a que en condiciones de aire acondicionado no se alcanza esa temperatura máxima. Si se presenta un fallo en el aire acondicionado debe registrarse.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 04	PAGINA: 7 de 25
DETERMINACIÓN DE CARBOXIHEMOGLOBINA POR REDUCCIÓN CON DITIONITO Y ESPECTROFOTOMETRÍA		P-DCF-ECT-TOX-29

7 Procedimiento:

7.1 Preparación inicial.

7.1.1 Utilice gabacha, guantes desechables y lentes de seguridad.

7.1.2 Para la preparación, verificación y conservación de reactivos y materiales críticos, así como de material de referencia y de disoluciones preparadas a partir de CRM refiérase al Procedimiento para el manejo general de casos en la Sección de Toxicología Forense.

7.1.3 Seleccione los objetos registrados en el SADCF y pendientes de análisis que pueden formar parte de un grupo de muestras de análisis en serie para determinación de COHb de la Base de datos "Manejo de solicitudes y RAS".

Nota 2: La Base de datos "Manejo de solicitudes y RAS" contiene los casos y objetos registrados en el SADCF y pendientes de análisis. Dicha base de datos se alimenta con los datos de cada caso posterior a que se realiza la apertura o se registra en el SADCF una toma de muestra (en los casos de pacientes muestreados por personal de la sección en el DCF). A partir de la información incluida en esta base de datos, se generan las listas de objetos a incluir en un proceso de análisis en serie de COHb.

Nota 3: Las muestras de sangre para análisis de COHb se analizan en grupos de análisis en serie, que varían su número de muestras dependiendo de la demanda del análisis, se debe tratar de analizar todas las muestras lo antes posible una vez ingresen al laboratorio. El análisis de COHb es de carácter urgente, por lo que debe realizarse el análisis, aunque exista sola una muestra pendiente de análisis.

7.1.4 Seleccione, de la Base de datos "Manejo de solicitudes y RAS", de la hoja "Pendientes COHb" la información para generar una lista de objetos a analizar en un proceso de análisis en serie. Utilice esta información para actualizar la hoja denominada "Lista RAS COHb".

7.1.5 Entregue la lista al encargado de la bodega de indicios para que proceda a buscar las muestras y entregarlas por el SADCF al funcionario encargado del análisis.

7.1.6 Reciba el grupo de muestras para análisis en serie por medio del SADCF, verifique los números de objeto recibidos contra la Base de datos "Manejo de solicitudes y RAS"; además solicite al perito encargado de la revisión del proceso RAS que realice la revisión y verificación de los números de objeto recibidos.

7.1.7 Proceda a crear el Proceso RAS dentro del SADCF con las muestras recibidas para análisis.

7.1.8 Saque del desecador las alícuotas de ditionito de sodio que va a necesitar, si no hay ditionito preparado proceda a prepararlo según el Anexo No. 1. Tome la disolución de hidróxido de amonio 0,12 M y colóquela dentro de la capilla de extracción de gases o cabina de bioseguridad.

7.1.9 Saque de la refrigeradora una alícuota de control normal y una de control positivo con concentración aproximada al 50% de COHb. Si no quedan controles alícuotados, prepárelos como lo indica el anexo 01.

7.1.10 Coloque los controles junto con las muestras incógnitas de sangre en el agitador por inversión por aproximadamente 20 minutos.

7.1.11 Si incluye muestras de tejido, asegúrese de descongelarlas antes de utilizar, colocando dentro de un recipiente con agua del grifo por al menos 1 hora.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 04	PAGINA: 8 de 25
DETERMINACIÓN DE CARBOXIHEMOGLOBINA POR REDUCCIÓN CON DITIONITO Y ESPECTROFOTOMETRÍA		P-DCF-ECT-TOX-29

7.2 Disolución de muestras y controles en hidróxido de amonio.

- 7.2.1** Rotule tres balones aforados de 25 mL por cada muestra o control a analizar (triplicado). Realice la rotulación de los balones por medio de etiquetas impresas que presenten la numeración de forma clara y evidente.
- 7.2.2** Llene cada balón aforado de 25 mL a la mitad aproximadamente, utilizando una pizeta con disolución de hidróxido de amonio 0,12 M.
- 7.2.3** Verifique la correspondencia de las muestras y controles con los balones a utilizar. Agregue 100 µl de cada muestra o control a los tres balones de 25 mL (triplicado) que tienen el hidróxido de amonio. Afore con hidróxido de amonio 0,12 M. En el caso de las muestras de tejido ver el punto 7.3.
- 7.2.4** Tape, mezcle la solución y deje en reposo por al menos 2 min.

7.3 Preparación de muestras de tejido.

Nota 3: La muestra de tejido que se puede utilizar en el análisis es el bazo, y lo que se analiza no es el tejido en sí, sino la sangre que contiene.

- 7.3.1** Tome directamente con la micropipeta la sangre contenida en el recipiente que contiene la muestra de bazo siempre que sea posible.
- 7.3.2** Centrifugue el tubo que contiene la muestra al menos a 3000 r.p.m. durante aproximadamente 15 minutos si es necesario para sacar la sangre contenida en el tejido. Tome la sangre inmediatamente después de la centrifugación para que el tejido no la absorba de nuevo
- 7.3.3** Deposite la sangre en los balones correspondientes como se indica en 7.2.3.

7.4 Lectura en el UV/VIS.

- 7.4.1** Busque el archivo COHb ditionito 0-100%.MCN que se encuentra en C:/UV-VIS Varian 50 BIO/CO/Ditionito/Método de lectura. De un doble clic a este archivo.

Nota 4: Este archivo abre automáticamente el software de equipo y carga los parámetros de lectura. Verifique que las condiciones son las mismas que se indican en el Anexo 2.

- 7.4.2** Transfiera 3,0 mL de hidróxido de amonio 0,12 M a una cubeta de plástico. Agregue una alícuota de 10 mg de ditionito, tape con papel parafilm y mezcle por inversión aproximadamente 10 veces, coloque en el espectrofotómetro y ajuste el cero.
- 7.4.3** En la pantalla principal del programa oprima la opción "Preparar". Se desplegará una pantalla con varias cejillas. Presione en la cejilla "Muestras". Llene la información de los controles y muestras que va a analizar, iniciando con la sangre control normal, el control de 50% de COHb y luego las muestras incógnitas en orden creciente con el número de objeto, el equipo ya tiene definido que se trata de un análisis por triplicado, solo es necesario ingresar la información una vez por muestra o control.
- 7.4.4** En la pantalla principal del programa oprima en la opción "INICIAR". Se despliega una pantalla con la lista de muestras que se van a analizar. No oprima "OK" todavía.
- 7.4.5** Tome los tres balones de la muestra de sangre control normal de COHb, pase aproximadamente la mitad del volumen a Beakers de 50, 100 o 150 mL si va a utilizar un equipo volumétrico que no puede ingresar en el balón.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 04	PAGINA: 9 de 25
DETERMINACIÓN DE CARBOXIHEMOGLOBINA POR REDUCCIÓN CON DITIONITO Y ESPECTROFOTOMETRÍA		P-DCF-ECT-TOX-29

- 7.4.6** Agregue 3,0 mL de cada uno de los balones en cubetas de 10 mm que previamente contenían 10 mg de ditionito de sodio. Verifique la correspondencia de la rotulación de los balones con las cubetas a utilizar.
- 7.4.7** Tape cada cubeta con papel Parafilm y agite por inversión aproximadamente 10 veces. Registre inmediatamente la hora (hh:mm:ss) sumando 5 minutos en el Registro de Análisis en Serie.
- 7.4.8** Si requirió el uso de los beakers en el punto 7.4.5, deseche el contenido de los beaker en un recipiente plástico para desecho y enjuague los Beakers tres veces con agua desionizada desechando en este mismo recipiente. Escurra bien los Beakers y déjelos boca abajo sobre papel.
- 7.4.9** Cuando el reloj llegue al tiempo de lectura de las tres réplicas de la muestra de sangre control normal de COHb, coloque la cubeta en el equipo y oprima OK en el mensaje en la pantalla. El software le irá indicando mediante un mensaje en la pantalla cuál muestra/control debe leer. Deseche las cubetas que va sacando del equipo en el recipiente plástico para desecho. Verifique la correspondencia de la cubeta utilizada con respecto a la muestra o control que indica el software.
- Nota 5: El equipo está programado para leer las muestras/controles tanto a 541 como a 555 nm.
- 7.4.10** Continúe de la misma manera con las siguientes muestras o controles hasta terminar. Recuerde verificar la correspondencia de la rotulación de los balones con las cubetas a utilizar y de la cubeta utilizada con respecto a la muestra o control que indica el software.
- 7.4.11** Al final guarde la información como "COHb dd-mm-aa.BKN" (u otro formato compatible) en el directorio "UV-VIS Varian 50 BIO/CO/Ditionito" (accediendo a "Fichero" en el menú principal del programa, opción "salvar datos como")
- 7.4.12** Llene la información de la bitácora de control del equipo.
- 7.4.13** Salga del programa Cary Win UV pero no apague la computadora.
- 7.4.14** Coloque el recipiente plástico con el desecho en la pila y agregue hipoclorito de sodio al 0,5%.
- 7.4.15** Repita el análisis de los casos en otro proceso de análisis en serie (Todo resultado debe ser confirmado con la repetición del análisis).

8 Criterios de Aceptación o Rechazo de Resultados:

No.	Criterio de Aceptación	Valor Límite	Corrección Aplicable
1	La diferencia entre las réplicas para muestras y controles no debe ser mayor a un 5 %. En valor de relación de absorbancias	5% CV	Si la variación entre réplicas es mayor a un 5 % debe analizarse 3 réplicas más, si estas segundas réplicas si cumplen, deben reportarse las segundas. Si el problema persiste debe hacerse un promedio de las 6 réplicas realizadas y reportar tres veces este promedio, esto debe

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 04	PAGINA: 10 de 25
DETERMINACIÓN DE CARBOXIHEMOGLOBINA POR REDUCCIÓN CON DITIONITO Y ESPECTROFOTOMETRÍA		P-DCF-ECT-TOX-29

			indicarse en las observaciones de la hoja de cálculo para COHb.
2	Sesgo del control de 50% COHb menor al 20%. Con respecto al valor asignado por análisis históricos.	± 20%	Si el valor obtenido para el control de 50% COHb difiere en más de un 20% del valor esperado, debe repetirse la preparación y el análisis del control. Si no se corrige debe repetirse el análisis de las muestras.
3	Diferencia entre el resultado del primer y segundo análisis: Para valores <25% COHb la diferencia absoluta debe ser < 5% COHb Para valores >25% COHb la diferencia debe ser <20% relativo	<25% COHb: diferencia absoluta <5% COHb. >25% COHb: diferencia relativa <20%	Repetir los análisis una tercera vez y reportar el resultado del primer análisis de los dos que concuerden.
4	De la muestra de tejido debe obtenerse sangre que se disuelva bien en la disolución de hidróxido de amonio.	Sangre presente en tejido y soluble en el hidróxido de amonio.	Si no se puede obtener sangre del tejido o al analizarla esta presenta poca solubilidad en el hidróxido de amonio o poca reproducibilidad la muestra debe considerarse insatisfactoria.

9 Cálculos y evaluación de la incertidumbre:

9.1 Cálculos:

- 9.1.1** Calcule el porcentaje de carboxihemoglobina y su incertidumbre utilizando la hoja de cálculo denominada "Hoja cálculo de carboxihemoglobina" que se encuentra en el servidor "Toxicología-Documents" con la siguiente dirección: H:\reporte\COHb.
- 9.1.2** Ingrese la información (valores de absorbancia e identidad) de las muestras y controles en la hoja de cálculo.
- 9.1.3** Revise si las diferencias entre réplicas en las muestras y los controles es aceptable y si la exactitud de los controles es la adecuada de acuerdo con el punto 8 de este PON.
- 9.1.4** Proceda según se indica en el apartado 8 "Criterios de Aceptación o Rechazo de Resultados" si la diferencia entre réplicas no es aceptable o la exactitud del control no es adecuada.
- 9.1.5** Imprima como un archivo en .pdf el formulario "Reporte de carboxihemoglobina" de las muestras junto con los datos originales del UV.
- 9.1.6** La fórmula para el cálculo del porcentaje de carboxihemoglobina se describe a continuación:

$$\%COHb = \frac{((\text{Promedio Abs } 541/555) - b)}{m}$$

Donde:

%COHb = % de carboxihemoglobina

b = intercepto

m = pendiente

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 04	PAGINA: 11 de 25
DETERMINACIÓN DE CARBOXIHEMOGLOBINA POR REDUCCIÓN CON DITIONITO Y ESPECTROFOTOMETRÍA		P-DCF-ECT-TOX-29

9.1.7 La fórmula para el cálculo de la diferencia (valor absoluto) entre el porcentaje de carboxihemoglobina del primer y segundo análisis cuando el resultado del primer análisis es <25 COHb se describe a continuación:

$$\text{Diferencia (\%COHb)} = [(\text{Resultado primer análisis} - \text{Resultado del segundo análisis})]$$

9.1.8 La fórmula para el cálculo de la diferencia porcentual entre el porcentaje de carboxihemoglobina del primer y segundo análisis cuando el resultado del primer análisis es >25% COHb se describe a continuación:

$$\text{Diferencia (\%COHb)} = \frac{(\text{resultado primer análisis} - \text{resultado segundo análisis})}{\text{resultado primer análisis}} \times 100$$

10 Reporte de Análisis y Resultados:

10.1 Incorpore, a través de un proceso de análisis en serie, en el legajo digital de cada caso el reporte generado en 9.1.5.

10.2 Reporte los resultados en el SADCF y en el Dictamen Criminalístico.

Nota 1: Para reportar un resultado de carboxihemoglobina debe contarse con la confirmación del resultado por medio de la repetición del análisis. Se reporta el resultado del primer análisis, el segundo análisis es una confirmación.

10.3 Reporte los resultados de porcentaje de carboxihemoglobina y la incertidumbre asociada de la primera muestra analizada, como lo indica el apartado "Reporte de resultados del PON Manejo General de Casos en la Sección de Toxicología Forense.

11 Medidas de Seguridad y Salud Ocupacional.

11.1 Utilice siempre gabacha, anteojos de seguridad y guantes desechables al manipular las muestras.

11.2 Para las etapas del proceso que se realizan en la capilla de extracción de gases utilice mascarilla N95 o similar.

11.3 Siempre que salga del área de laboratorios, deseche los guantes, lavase las manos y deje la gabacha en la entrada de este.

11.4 Informe cualquier accidente donde se presuma contacto con material bio-infeccioso al Jefe de Sección o quién este encargado del laboratorio en ese momento para que se le indique el procedimiento a seguir.

11.5 Si ocurre un derrame de algún reactivo refiérase al Manual de Seguridad y Salud Ocupacional del Departamento de Ciencias Forenses.

11.6 Si ocurre contacto de algún reactivo con los ojos, acuda inmediatamente a la ducha para ojos que se encuentra en el laboratorio.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 04	PAGINA: 12 de 25
DETERMINACIÓN DE CARBOXIHEMOGLOBINA POR REDUCCIÓN CON DITIONITO Y ESPECTROFOTOMETRÍA		P-DCF-ECT-TOX-29

12 Simbología:

% CV: Coeficiente de Variación Porcentual

COHb: Carboxihemoglobina.

CRM: Material de referencia certificado.

DCF: Departamento de Ciencias Forenses.

dd-mm-aa: día, mes y año.

ddMmmaa: día, mes y año.

N/A: No aplica.

O.I.J: Organismo de Investigación Judicial.

pa: para análisis

PDF: Formato de documento portátil.

PON: Procedimiento de Operación Normado.

RAS: Registro de Análisis en Serie.

rpm: revoluciones por minuto.

SADCF: Sistema automatizado del Departamento de Ciencias Forenses.

TA: Temperatura ambiente

UV-VIS: Espectrofotometría Ultravioleta Visible.

13 Terminología:

Control normal: Corresponde a una muestra de sangre que presenta una proporción de COHb menor al 10%. Se analiza junto con las muestras incógnitas a manera de control negativo.

Muestra incógnita: Muestra de sangre o tejido que se desea analizar para determinar el porcentaje de carboxihemoglobina.

14 Anexos

No. de Anexo	Nombre del Anexo
1	Preparación de reactivos
2	Parámetros de lectura de %COHb en el UV/Vis
3	Ejemplo de estimación de incertidumbre en la determinación del porcentaje de carboxihemoglobina (COHb%) en sangre

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 04	PAGINA: 13 de 25
DETERMINACIÓN DE CARBOXIHEMOGLOBINA POR REDUCCIÓN CON DITIONITO Y ESPECTROFOTOMETRÍA		P-DCF-ECT-TOX-29

Anexo No. 1

Preparación de reactivos

Preparación de una disolución de hipoclorito de sodio al 0,5 %.

1. Verifique en la etiqueta de la disolución de cloro concentrada que se adquiere comercialmente la concentración de esta.
2. Determine el volumen que necesita de la disolución de cloro concentrada para preparar el volumen requerido de la disolución de cloro al 0,5%, utilizando la siguiente formula:

$$(Cd) \times (Vd) = (Cc) \times (V)$$

despejando se obtiene: $(V) = (Cd) \times (Vd) / (Cc)$

donde:

(Cd): Concentración deseada, 0,5%.

(Vd): Volumen requerido de la disolución de la concentración deseada a preparar.

(Cc): Concentración conocida de la disolución de cloro concentrada que se adquiere comercialmente

(V)= Volumen en mililitros de la disolución de cloro concentrada que se adquiere comercialmente de concentración conocida.

3. Utilizando una probeta adecuada al volumen a medir, adicione el volumen de la disolución de cloro concentrada adquirida comercialmente(V) al recipiente que va a contener la disolución de cloro al 0,5% (ejemplo: el recipiente puede ser una pizeta de 500mL, Vd= 500 mL).
4. Utilizando una probeta adecuada al volumen a medir, adicione el volumen de agua desionizada necesario para completar el volumen de la disolución de cloro al 0,5% deseado.
5. Agite suavemente por inversión manual. Identifique el recipiente que va a contener la disolución preparada como "Disolución de cloro al 0,5%" y rotule con la fecha de preparación e iniciales de quién la prepara.
6. Almacene a temperatura ambiente. Esta disolución es estable al menos por 3 meses.

Ejemplo: en el siguiente cuadro se presentan ejemplos de algunos volúmenes y concentraciones utilizadas en la preparación de una disolución de cloro al 0,5%:

Concentración deseada (Cd: %)	Volumen de la disolución de la concentración deseada (Vd: mL)	Concentración conocida de la disolución de cloro concentrada (Cc: %)	Volumen de la disolución de cloro concentrada, se adquiere comercialmente (V: mL)	Volumen necesario agregar de agua destilada para completar el volumen de la disolución de cloro deseada (mL)
0,5	500	12	21	479
0,5	1000	12	42	958
0,5	500	10	25	475
0,5	1000	10	50	950

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 04	PAGINA: 14 de 25
DETERMINACIÓN DE CARBOXIHEMOGLOBINA POR REDUCCIÓN CON DITIONITO Y ESPECTROFOTOMETRÍA	P-DCF-ECT-TOX-29	

Disolución de hidróxido de amonio (0,12 mol/L)

1. Adicione con probeta 15,9 mL de hidróxido de amonio concentrado en un balón aforado de 1000 mL. Afore con agua desionizada.
2. Almacene en botella de vidrio ámbar (la solución es estable por un año a temperatura ambiente). Pase una parte a una pizeta de 250 mL.

Ditionito de sodio

1. Pese 10 mg de ditionito de sodio directamente en las cubetas de plástico de 3 mL de 10 x 10 mm.
2. Utilice de inmediato o almacene en desecación por 1 año máximo.

Preparación del control con concentración aproximada al 50% de COHb.

1. Agregue en 2 tubos cónicos de 15 mL, 5 mL de sangre control normal. Rotule uno como patrón de 0% COHb y el otro como patrón de 100% COHb.
2. Abra los cilindros de oxígeno y monóxido y corrobore que no existan fugas mojando con líquido detector de fugas en las conexiones.
3. Ajuste el flujo de los gases a un burbujeo constante colocando la salida de la manguera en un beaker con agua.
4. Inserte dos agujas de jeringa en la tapa de cada tubo. Coloque en el agitador rotatorio dentro de la capilla de gases. Conecte la manguera con el oxígeno a una de las agujas del tubo rotulado como patrón de 0% COHb. Conecte la manguera con el monóxido a una de las agujas del tubo rotulado como patrón de 100% COHb. Fije los tubos al agitador utilizando ligas.
5. Aplique flujo de oxígeno/monóxido de carbono por 15 min.
6. Al finalizar los 15 min retire el flujo de oxígeno / monóxido de carbono, cambie la tapa por una sin perforar y agite por inversión 15 min más. Asegúrese de cerrar los cilindros de gases.
7. En otro tubo cónico de 15 mL rotulado como control al 50% de COHb, dispense los 5 mL de patrón de 100% de carboxihemoglobina y los 5 mL del patrón de 0 % COHb. Agite por inversión.
8. Trasvase 0,5 mL de la sangre a microtubos tipo eppendorf de 0,5 mL y guarde en refrigeración.
9. Estos controles son estables al menos 6 meses.

Preparación del control normal de COHb.

1. Obtenga uno o varios tubos de tapón color gris con al menos 10 mL de sangre de alguna persona del laboratorio que no esté expuesta al monóxido (no fumadores).
2. Trasvase 0,5 mL de la sangre a microtubos tipo eppendorf de 0,5 mL y guarde en refrigeración.
3. Estos controles son estables al menos un año.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 04	PAGINA: 15 de 25
DETERMINACIÓN DE CARBOXIHEMOGLOBINA POR REDUCCIÓN CON DITIONITO Y ESPECTROFOTOMETRÍA	P-DCF-ECT-TOX-29	

Anexo No. 2

Parámetros de lectura de %COHb en el UV/Vis

The screenshot shows a software window titled "Preparar" with a menu bar containing "Cary", "Patrones", "Muestras", "Accesorios1", "Accesorios2", "Muestreadores", "Informe", and "Auto". Below the menu bar is the "Control del Instrumento" section. Underneath, there is a sub-section labeled "Instrumento" with the following settings:

- Resultado Usuario: Read(541)/Read(555) (dropdown menu)
- Def. por Usuario
- T. Med. (sec): 0,1000 (spin box)
- Y Mín: 0,0000 (text box)
- Replicados: 1 (spin box)
- Y Máx: 2,0000 (text box)
- Muestra/Patrón Media: 3 (spin box)
- Monitor: Bloqueado (checkbox)

At the bottom of the window, there is a checkbox for "Mostrar pantalla de estado" (unchecked) and three buttons: "OK", "Cancelar", and "Ayuda". A large diagonal watermark "COPIA NO CONTROLADA" is overlaid on the image.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 04	PAGINA: 16 de 25
DETERMINACIÓN DE CARBOXIHEMOGLOBINA POR REDUCCIÓN CON DITIONITO Y ESPECTROFOTOMETRÍA		P-DCF-ECT-TOX-29

Anexo No. 3

Ejemplo de estimación de incertidumbre en la determinación del porcentaje de carboxihemoglobina (COHb%) en sangre

Antecedentes:

- Este análisis se utiliza para la determinación del porcentaje de carboxihemoglobina (COHb%) en sangre realizado en la Sección de Toxicología, se lleva a cabo por medio de una reducción con ditionito y lectura con espectrofotometría de la relación de Absorbancias de la muestra a 541 nm y 555 nm (Abs 541/555).
- Las muestras se someten a un proceso de dilución (Dilución de 100 uL de la muestra de sangre en 25 mL de disolución de hidróxido de amonio 0,12 M.) y una posterior reducción (Reducción con ditionito: alícuota de 3mL de la dilución con 10 mg de ditionito).
- La cuantificación se realiza en un ámbito de 0 a 100 % de COHb%, por medio de una curva de calibración utilizando los valores teóricos de los parámetros de la referencia: Tietz N W, Fiereck E. 1973. The Spectrometric Measurement of Carboxyhemoglobin. Ann Clin Lab Sci vol. 3 no. 1 36-42. El análisis de las muestras se realiza por triplicado.
- Los equipos de medición utilizados tienen trazabilidad demostrada por medio de los certificados de calibración de cada equipo.
- La determinación se controla por medio de un control en sangre preparado en una concentración de 50% de COHb% y la participación en estudios interlaboratoriales.

Datos de la curva de calibración de la metodología:

Datos de la curva de calibración lineal	
$[COHb\%] = (Relación\ de\ Absorbancia\ 541/555 - Intercepto) / Pendiente$	
<i>y</i> = Relación de Absorbancias de la muestra a 541 nm y 555 nm (Abs 541/555) <i>x</i> = Porcentaje de carboxihemoglobina en la muestra [COHb%] Intercepto (b) = 0,825 (valor del intercepto de acuerdo a referencia de *Tietz) Pendiente (m) = 0,00400 (valor de la pendiente de acuerdo a referencia de *Tietz)	$[COHb\%] = (Abs\ 541/555 - 0,825) / 0,00400$

Valores teóricos de la curva de calibración según Tietz*				
[COHb%]	Abs 541/555	Y ± U	Pendiente	Intercepto
0	0,825	0,005	0,00400	0,825
100	1,225	0,005		

* Referencia: Tietz N W, Fiereck E. 1973. The Spectrometric Measurement of Carboxyhemoglobin. Ann Clin Lab Sci vol. 3 no. 1 36-42.

Valores de referencia para la carboxihemoglobina**	
Población	[COHb %]
No fumadores	< 2%
Fumadores	< 10%
Efectos de intoxicación	> 25 %

**Referencia: Baselt R, Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. Eighth Edition. Chemical Toxicology Institute. Foster City, California, USA, 2008.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 04	PAGINA: 17 de 25
DETERMINACIÓN DE CARBOXIHEMOGLOBINA POR REDUCCIÓN CON DITIONITO Y ESPECTROFOTOMETRÍA		P-DCF-ECT-TOX-29

-Ejemplo de los valores del resultado del análisis de una muestra utilizada como ejemplo para la estimación de su incertidumbre son los siguientes:

Absorbancia 541/555 de la muestra			n	promedio	RSD%
1,0349	1,0344	1,0343	3,0	1,0345	0,03

Proceso de estimación de incertidumbre:

1. Definición de mensurando: Porcentaje de carboxihemoglobina en sangre (COHb%), en muestras de sangre anticoagulada recolectada en tubos de capacidad variable. El porcentaje de COHb% es obtenido por la interpolación en la curva de calibración, del valor promedio de las tres réplicas de la relación de absorbancias de la muestra a 541 nm y 555 nm (Abs 541/555). Las mediciones de absorbancia se realizan utilizando el equipo Espectrofotómetro ultravioleta visible (UV-VIS) Varian Cary 50 BIO, para cubeta de 1 cm de paso de luz de sistema óptico de doble haz interno.

2. La función de medición es:

$$C_m = C_{ob} \cdot F_{mt}$$

Donde:

Cob = concentración de analito (%COHb), obtenido a partir de la interpolación en la curva

Cm = concentración de analito en la muestra de sangre en %COHb

Fmt = factor por la variación total del método con valor de 1.

La función medición de Cob es:

$$\%COHb = \frac{((Promedio\ Abs\ 541/555) - b)}{m}$$

Donde:

%COHb = porcentaje de carboxihemoglobina = valor de x = Cob

Abs 541/555 = Relación de Absorbancias de la muestra a 541 nm y 555 nm = valor de y

b = 0,825 (valor del intercepto de acuerdo con referencia de *Tietz) = Intercepto (b)

m = 0,00400 (valor de la pendiente de acuerdo con referencia de *Tietz) = Pendiente (m)

La concentración de analito es interpolada de una curva de calibración de la forma $Y = mx + b$ que relaciona la relación de Absorbancias (variable dependiente) con la concentración del analito (variable independiente).

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 04	PAGINA: 18 de 25
DETERMINACIÓN DE CARBOXIHEMOGLOBINA POR REDUCCIÓN CON DITIONITO Y ESPECTROFOTOMETRÍA		P-DCF-ECT-TOX-29

3. Lista de fuentes de incertidumbre:

a- El análisis presenta una fuente de incertidumbre aleatoria asociada a la reproducibilidad de la medición, cuantificada por el coeficiente de variación porcentual del control positivo preparado en sangre de 50% de COHb%. Dentro de esta fuente se incluye la influencia de diferentes preparaciones de reactivos, diferentes analistas, diferentes condiciones ambientales, diferentes equipos volumétricos y cualquier otra fuente que afecte de forma aleatoria la determinación.

b- Los equipos de medición volumétrica utilizados en la dilución y reducción de la muestra presentan incertidumbres que pueden afectar la medición, las mismas se consideran que han sido valoradas en el coeficiente de variación porcentual del control positivo preparado en sangre de 50% de COHb%, sin embargo, se utiliza el valor de tolerancia del equipo como su estimador de incertidumbre y valorar su influencia como fuente.

c- El análisis presenta una fuente de incertidumbre sistemática asociada al sesgo de la metodología, la cual es valorada por medio del sesgo% de los estudios interlaboratoriales en los que ha participado el laboratorio.

d- Los parámetros del ajuste lineal (pendiente e intercepto) pueden ocasionar una fuente de incertidumbre en el valor cuantitativo de la metodología, esta fuente es valorada dentro del sesgo% de los estudios interlaboratoriales en los que ha participado el laboratorio.

e- Variabilidad total del método, la falta de veracidad del método está influenciada por errores sistemáticos (valorados por el sesgo) y errores aleatorios (valorados por la precisión). Dentro de esta fuente de incertidumbre están asumidas todas las fuentes anteriores: las incertidumbres de los volúmenes medidos en el proceso de preparación de la muestra, la influencia por la utilización de los parámetros del ajuste en la estimación de una concentración, diferentes preparaciones de reactivos, diferentes analistas, el sesgo y la reproducibilidad del método.

4. Cuantificar la variabilidad de cada fuente:

a- Reproducibilidad de la medición: cuantificada por el coeficiente de variación porcentual del control positivo preparado en sangre de 50% de COHb%. Para la estimación de este parámetro se utilizaron 49 promedios de las mediciones provenientes de tres réplicas para un total de 147 datos, las mediciones fueron realizadas en un periodo aproximado de dos años y medio.

Promedio COHb%	52,38
RSD%	4,36

b Incertidumbre de los equipos de medición volumétrica utilizados en la dilución y reducción de la muestra: se utiliza las tolerancias asignadas a cada equipo:

Equipo	Tolerancia %
Micropipeta de 100uL	1
Micropipeta de 5000uL	1
Balón aforado 25mL	0,16

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 04	PAGINA: 19 de 25
DETERMINACIÓN DE CARBOXIHEMOGLOBINA POR REDUCCIÓN CON DITIONITO Y ESPECTROFOTOMETRÍA		P-DCF-ECT-TOX-29

c- Sesgo de la metodología: cuantificada por medio del sesgo% de los estudios interlaboratoriales en los que ha participado el laboratorio. Para esta estimación se utilizó una combinación de la raíz media cuadrática del sesgo% obtenido en los estudios y la incertidumbre asociada al valor asignado o utilizado como referencia. Se utilizaron las siguientes formulas:

$$u(c_{ref}) = \frac{\sum_{i=1}^N u(c_{ref\ i})}{N} \quad RMS_{bias} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N bias_i^2}{N}} \quad u(bias) = \sqrt{RMS_{bias}^2 + u(c_{ref})^2}$$

Donde:

N: número de estudios interlaboratoriales en los que ha participado el laboratorio

u(Cref): incertidumbre del valor asignado o de referencia del estudio

RMSbias : raíz media cuadrática del sesgo% obtenido en los estudios : RMSsesgo%

bias: sesgo% obtenido en los estudios

u(bias): incertidumbre del sesgo% del laboratorio determinado por la participación en los estudios interlaboratoriales: u(sesgo%)

Datos de los estudios interlaboratoriales de LGC utilizados en la estimación de la incertidumbre									
Código	BLD181	BLD185	TX227	TX229	TX231	TX232	TX243	TX248	TX261
Valor asignado	56,9	71,2	19,3	6,7	20,4	52,1	64,9	36,3	70,8
Valor medido	54,4	68,7	20,2	7,0	20,5	51,3	66,1	38,3	66,9
sesgo%	-4,39	-3,51	4,66	4,48	0,49	-1,54	1,85	5,51	-5,51
u(Cref)%	1,02	0,96	1,92	4,26	2,06	0,83	1,06	1,32	1,05

RMSsesgo%:	3,95
u(Cref)%:	1,61
u(sesgo%):	4,26

e- Como estimador de la variabilidad total del método se utilizó la combinación de las fuentes anteriores, como lo muestra el siguiente cuadro:

Fuente de Incertidumbre	Tipo	RSD o tolerancia (%)	Modelo de distribución	Divisor	Incertidumbre estándar
Reproducibilidad de la metodología (RSD%)	A	4,36	Normal	1	4,36
Sesgo de la metodología [u(sesgo%)]	A	4,26	Normal	1	4,26
Micropipeta de 100uL (T%)	B	1,00	Rectangular	$\sqrt{3}$	0,58
Micropipeta de 5000uL (T%)	B	1,00	Rectangular	$\sqrt{3}$	0,58
Balón aforado 25mL (T%)	B	0,16	Rectangular	$\sqrt{3}$	0,092
u%:					6,2
U% (k:2, 95,45%):					12,4

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 04	PAGINA: 20 de 25
DETERMINACIÓN DE CARBOXIHEMOGLOBINA POR REDUCCIÓN CON DITIONITO Y ESPECTROFOTOMETRÍA		P-DCF-ECT-TOX-29

5.1 Estimación de concentración de la muestra y su incertidumbre combinada: se realiza la interpolación de la concentración en la curva de calibración ponderada de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\%COHb = \frac{((Promedio\ Abs\ 541/555) - b)}{m}$$

Donde:

%COHb = porcentaje de carboxihemoglobina = valor de x = Cob

Abs 541/555 = Relación de Absorbancias de la muestra a 541 nm y 555 nm = valor de y= para el presente ejemplo= 1,0345

b = 0,825 (valor del intercepto de acuerdo con referencia de *Tietz) = Intercepto (b)

m = 0,00400 (valor de la pendiente de acuerdo con referencia de *Tietz) = Pendiente (m)

Sustituyendo:

$$\%COHb = \left(\frac{1,0345 - 0,825}{0,00400} \right) = 52,375\%$$

La incertidumbre combinada para el valor x0 interpolado, de acuerdo con la fórmula general de combinación de incertidumbre, se obtiene a partir de la expresión general:

$$u_c(x_0) = \sqrt{\sum_{i=1}^N c_i^2 \cdot u_i^2}$$

Por lo que la incertidumbre se estima combinando las incertidumbres porcentuales (con coeficiente de sensibilidad $c_i=1$) provenientes de las diferentes fuentes que aportan a la variabilidad total del método presentaría la siguiente fórmula:

$$u_c(C_m)\% = \sqrt{[u_c(F_{mt})\%]^2}$$

$$u_c(C_m)\% = \sqrt{[RSD\%]^2 + [u(\text{sesgo}\%)]^2 + [u(\text{equipovolumétrico})]^2}$$

Sustituyendo obtenemos:

$$u_c(C_m)\% = \sqrt{[4,36\%]^2 + [4,26\%]^2 + [0,58\%]^2 + [0,58\%]^2 + [0,092\%]^2}$$

$$u_c(C_m)\% = 6,2\%$$

$$uc(Cm) = 6,2\% \text{ de } 52,375\%COHb$$

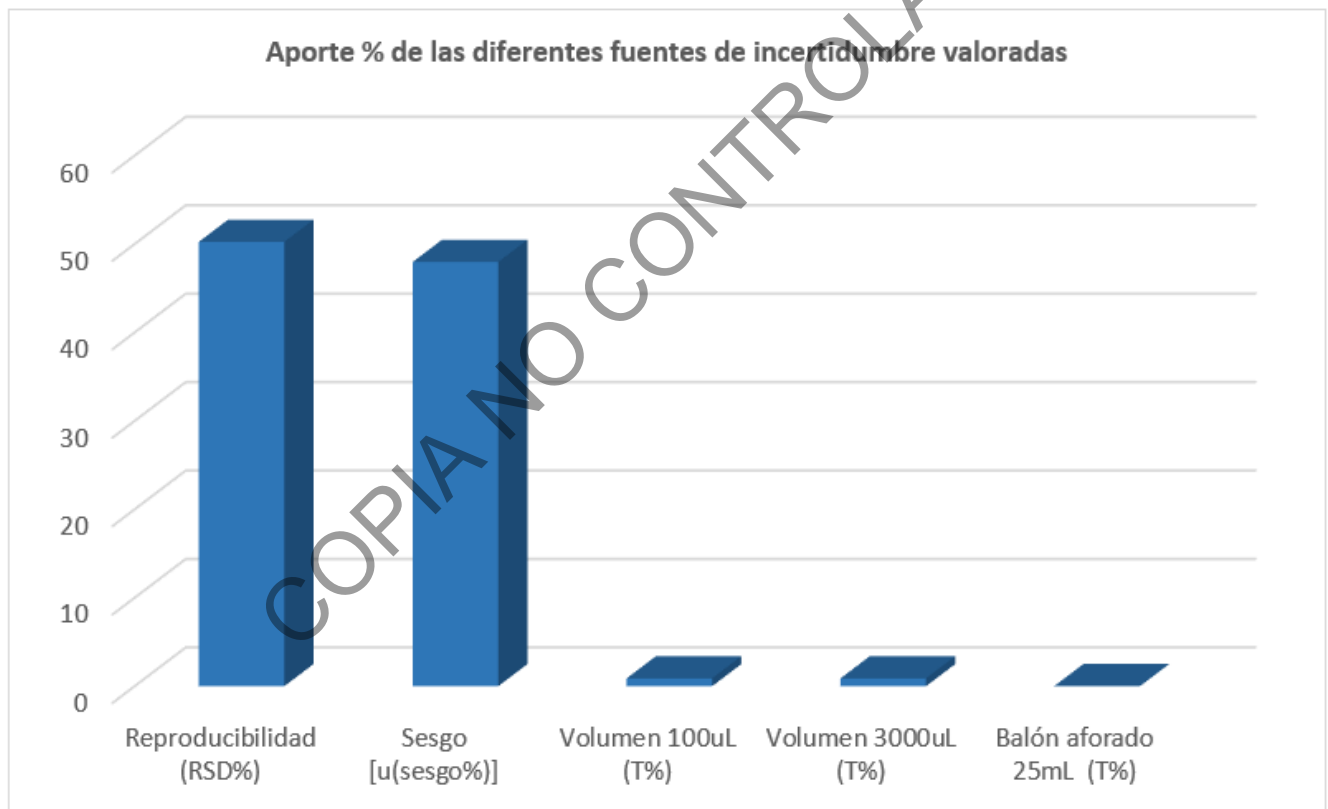
$$uc(Cm) = 3,25\%COHb$$

$$U(Cm) = uc(Cm) * k = 3,25\%COHb * 2 = 6,5\%COHb$$

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 04	PAGINA: 21 de 25
DETERMINACIÓN DE CARBOXIHEMOGLOBINA POR REDUCCIÓN CON DITIONITO Y ESPECTROFOTOMETRÍA		P-DCF-ECT-TOX-29

A continuación, se presenta un cuadro resumen de los aportes de las diferentes componentes de la incertidumbre de la concentración de analito en la muestra (C_m) y un gráfico que ilustra su porcentaje de aporte:

Componente	V_{eff}	$u\%$	$(u\%)^2$	Aporte %
Reproducibilidad ($RSD\%$)	48	4,36	19,010	50,25
Sesgo [$u(\text{sesgo}\%)$]	8	4,26	18,148	47,97
Volumen 100uL ($T\%$)	10000	0,58	0,333	0,88
Volumen 3000uL ($T\%$)	10000	0,58	0,333	0,88
Balón aforado 25mL ($T\%$)	10000	0,09	0,00853	0,023
$V_{eff} (C_m): 30$		$\Sigma: 37,83$		



El aporte de las fuentes correspondientes a los equipos volumétricos utilizados en el proceso de preparación de las muestras es menor al 1% para cada equipo, por lo que para este caso se pueden desestimar como fuentes de incertidumbre, las mismas se podría considerar que han sido valoradas en el coeficiente de variación porcentual del control positivo preparado en sangre de 50% de COHb%.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 04	PAGINA: 22 de 25
DETERMINACIÓN DE CARBOXIHEMOGLOBINA POR REDUCCIÓN CON DITIONITO Y ESPECTROFOTOMETRÍA	P-DCF-ECT-TOX-29	

6.1 Se elije para el caso en particular como probabilidad de cobertura un 0,9545 (95,45%).

7.1 Se cumple el teorema del límite central, por cuanto todas las fuentes de incertidumbre importantes tienen distribuciones normales o se asumen en el tratamiento como normales. Como los grados de libertad efectivos calculados con la fórmula de Welch-Satterwaite, son altos (30), se utiliza como factor de cobertura un valor z normal, correspondiente con una probabilidad de cobertura de 95,45%, el cual es 2.

8.1 Informe de la concentración y su incertidumbre:

$$C = (52,4 \pm 6,5) \%COHb \text{ (} k = 2; p = 0,9545; \text{ normal)}$$

De acuerdo con el resultado anterior, el valor verdadero de la concentración del analito en sangre se encontrará con una probabilidad del 95,45%, dentro del intervalo normal que está delimitado por los valores de concentración entre 45,9 %COHb y 58,9 %COHb, con estimador estadístico de tendencia central en 52,4 %COHb.

En el siguiente cuadro se muestran las incertidumbres expandidas de diferentes niveles de concentración distribuidos en el ámbito de análisis:

Incertidumbres en el ámbito de medición	
%COHb	U (k:2, 95,45%)
0	0,00
5,0	0,62
10	1,2
25	3,1
50	6,2
80	10
100	12

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 04	PAGINA: 23 de 25
DETERMINACIÓN DE CARBOXIHEMOGLOBINA POR REDUCCIÓN CON DITIONITO Y ESPECTROFOTOMETRÍA		P-DCF-ECT-TOX-29

5.2 Estimación de concentración de la muestra y su incertidumbre combinada: se realiza la interpolación de la concentración en la curva de calibración ponderada de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\%COHb = \frac{((Promedio\ Abs\ 541/555) - b)}{m}$$

Donde:

%COHb = porcentaje de carboxihemoglobina = valor de x = Cob

Abs 541/555 = Relación de Absorbancias de la muestra a 541 nm y 555 nm = valor de y= para el presente ejemplo= 1,0345

b = 0,825 (valor del intercepto de acuerdo con referencia de *Tietz) = Intercepto (b)

m = 0,00400 (valor de la pendiente de acuerdo con referencia de *Tietz) = Pendiente (m)

Sustituyendo:

$$\% = \left(\frac{1,0345 - 0,825}{0,00400} \right) = 52,375\%$$

La incertidumbre combinada para el valor x0 interpolado, de acuerdo con la fórmula general de combinación de incertidumbre, se obtiene a partir de la expresión general:

$$u_c(x_0) = \sqrt{\sum_{i=1}^N c_i^2 \cdot u_i^2}$$

Por lo que la incertidumbre se estima combinando las incertidumbres porcentuales provenientes de las diferentes fuentes que aportan a la variabilidad total del método presentaría la siguiente fórmula:

$$u_c(C_m)\% = \sqrt{[u_c(F_{mt})\%]^2}$$

$$u_c(C_m)\% = \sqrt{[RSD\%]^2 + [u(sesgo)\%]^2}$$

Sustituyendo obtenemos:

$$u_c(C_m)\% = \sqrt{[4,36\%]^2 + [4,26\%]^2}$$

$$u_c(C_m)\% = 6,1\%$$

$$uc(Cm) = 6,1\% \text{ de } 52,375\%COHb$$

$$uc(Cm) = 3,20\%COHb$$

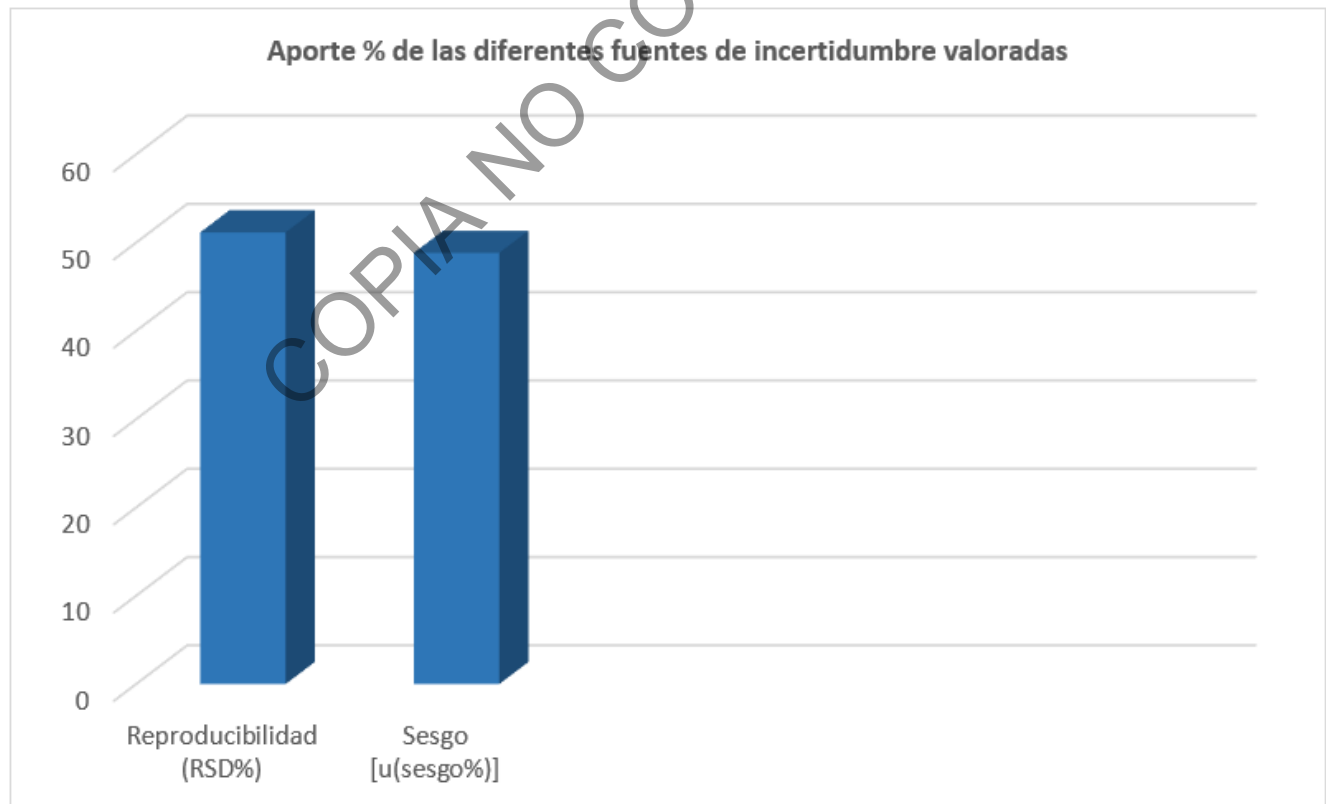
$$U(Cm) = uc(Cm)*k = 3,20\%COHb *2 = 6,4\%COHb$$

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 04	PAGINA: 24 de 25
DETERMINACIÓN DE CARBOXIHEMOGLOBINA POR REDUCCIÓN CON DITIONITO Y ESPECTROFOTOMETRÍA	P-DCF-ECT-TOX-29	

El aporte de las fuentes correspondientes a los equipos volumétricos utilizados en el proceso de preparación de las muestras se desestimó como fuentes de incertidumbre, las mismas se consideran que han sido valoradas en el coeficiente de variación porcentual del control positivo preparado en sangre de 50% de COHb%.

A continuación, se presenta un cuadro resumen de los aportes de las diferentes componentes que se consideraron importantes para la incertidumbre de la concentración de analito en la muestra (C_m) y un gráfico que ilustra su porcentaje de aporte:

Componente	V_{eff}	$u\%$	$(u\%)^2$	Aporte %
Reproducibilidad (RSD%)	48	4,36	19,010	51,16
Sesgo [$u(\text{sesgo}\%)$]	8	4,26	18,148	48,84
$V_{eff}(C_m): 28$		$\Sigma: 37,16$		



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 04	PAGINA: 25 de 25
DETERMINACIÓN DE CARBOXIHEMOGLOBINA POR REDUCCIÓN CON DITIONITO Y ESPECTROFOTOMETRÍA	P-DCF-ECT-TOX-29	

6.1 Se elije para el caso en particular como probabilidad de cobertura un 0,9545 (95,45%).

7.1 Se cumple el teorema del límite central, por cuanto todas las fuentes de incertidumbre importantes tienen distribuciones normales o se asumen en el tratamiento como normales. Como los grados de libertad efectivos calculados con la fórmula de Welch-Satterwaite, son altos (28), se utiliza como factor de cobertura un valor z normal, correspondiente con una probabilidad de cobertura de 95,45%, el cual es 2.

8.1 Informe de la concentración y su incertidumbre:

$$C = (52,4 \pm 6,4) \%COHb \text{ (} k = 2; p = 0,9545; \text{ normal)}$$

De acuerdo con el resultado anterior, el valor verdadero de la concentración del analito en sangre se encontrará con una probabilidad del 95,45%, dentro del intervalo normal que está delimitado por los valores de concentración entre 46,0 %COHb y 58,8 %COHb, con estimador estadístico de tendencia central en 52,4 %COHb.

En el siguiente cuadro se muestran las incertidumbres expandidas de diferentes niveles de concentración distribuidos en el ámbito de análisis:

Incertidumbres en el ámbito de medición	
%COHb	U (k:2, 95,45%)
0	0,00
5,0	0,61
10	1,2
25	3,1
50	6,1
80	10
100	12