

Document docent

Associació Catalana de Ciències de Laboratori Clínic
Secció d'Estadística i Metrologia¹

Pipetes. Aspectes generals i metrològics

Preparat per:
Aurora Blanco Font

Laboratori Clínic, Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat

ÍNDEX

1. Introducció
2. Definicions
3. Classificació de les pipetes
 - 3.1 Pipetes de vidre
 - 3.2 Pipetes de pistó (o d'èmbol)
4. Utilització de les pipetes
 - 4.1 Informació general
 - 4.2 Informació específica
 - 4.3 Procediment per pipetejar
 - 4.4 Errors més freqüents
5. Aspectes metrològics: descripció i estimació
6. Calibratge i verificació
 - 6.1 Mètode gravimètric
 - 6.2 Mètodes no gravimètrics
7. Manteniment
8. Bibliografia

¹Membres de la Secció d'Estadística i Metrologia durant la preparació d'aquest document: A. Blanco Font, B. Candás Estébanez, X. Fuentes Arderiu (president), M. Martínez Casademont, M. Mosquera Parrado, J.M. Queraltó Compañó, L. Rami Brualla, R. Rigo Bonnin, H. Valbuena Parralejo.

1. Introducció

Les pipetes formen part d'un grup d'instruments volumètrics que s'utilitzen per aspirar o abocar volums concrets de líquids.

Dintre del mateix grup d'instruments volumètrics, s'inclouen també les buretes, els dispensadors i els diluïdors. El present document docent no està orientat a aquests altres instruments de mesura, per la qual cosa d'ells només es donarà tot seguit una petita descripció per permetre diferenciar-los de les pipetes.

- Bureta: és un tub de vidre, amb divisions, que té una clau (o un pistó) que permet anar deixant sortir un líquid i determinar el volum final que s'ha abocat. En les buretes clàssiques, el líquid s'enrasa en la divisió del nivell superior que correspon a 0, mentre que la clau se situa en el nivell més inferior, a on hi ha el valor màxim.

S'acostumen a utilitzar per a volums de 5 a 50 mL.

- **Dispensador:** és un instrument que permet emetre de forma repetida un volum determinat de líquid. Aquest volum pot ser fix o variable, sent ajustat per l'usuari.

Actualment, existeixen buretes i dispensadors electrònics que tenen una gran qualitat metrològica i que poden automatitzar part del seu maneig (per exemple, els dispensadors poden tenir l'aspiració d'ompliment automàtic i la dispensació de buidat manual)

- **Diluïdor:** és un instrument que permet abocar de forma repetida volums determinats de més d'un líquid, fent dilucions concretes. Els volums es determinen per l'usuari.

Aquests diluïdors també poden ser electrònics, permetent utilitzar vàries xeringues d'aspiració-dispensació en el mateix equip, connectades per diversos sistemes de tubs i controlades per un dispositiu electrònic, per proporcionar diferents combinacions d'aspiració i de dilució.

- **Pipeta:** és un instrument que permet aspirar i abocar un volum determinat de líquid. Aquest volum pot ser fix o variable, i es pot emetre en un o més recipients alhora.

Dels instruments volumètrics que funcionen amb pistó (pipetes, buretes, diluïdors, dispensadors), es pot trobar la definició i els requisits a les normes UNE-EN ISO 8655-1, UNE-EN ISO 8655-2 i UNE-EN ISO 8655-6 (1, 2, 3).

2. Definicions

En aquest document són aplicables els termes i les definicions del Vocabulari Internacional de Metrologia (VIM) (4).

Tanmateix, l'esmentada norma UNE-EN ISO 8655 no sempre utilitza el VIM com a font per a aquestes definicions (pot fer referència a altres normes: ISO 3334-1, 5725-1, 10012-1, etc.).

calibratge: operació que, en unes condicions determinades, estableix en una primera etapa una relació entre els valors, amb les incerteses de mesura associades, obtinguts mitjançant uns patrons i les indicacions corresponents, amb les seves incerteses associades, i que després utilitza en una segona etapa aquesta informació per establir una relació que permet obtenir un resultat de mesura a partir d'una indicació

NOTA: La definició anterior és la del VIM3, però la norma ISO 8655 defineix el calibratge d'una pipeta com la comparació entre el volum nominal d'aquesta i el realment dispensat

error de mesura: diferència entre el valor mesurat i de referència d'una magnitud

incertesa de mesura: paràmetre no negatiu que caracteritza la dispersió dels valors atribuïts a un mesurand a partir de les informacions utilitzades

precisió de mesura: concordança entre les indicacions o els valors mesurats obtinguts mitjançant mesuraments repetits del mateix objecte o objectes similars en condicions especificades

resolució d'un dispositiu visualitzador: diferència més petita entre indicacions visualitzades que es pot percebre de forma significativa

traçabilitat metrològica: propietat d'un resultat de mesura gràcies a la qual aquest resultat pot ser relacionat amb una referència mitjançant una cadena

ininterrompuda i documentada de calibratges, que contribueixen a la incertesa de mesura

valor nominal: valor arrodonit o aproximat d'una magnitud característica d'un instrument de mesura o d'un sistema de mesura, que serveix de guia per al seu ús

NOTA: Per exemple, la marca de 100 mL que podem trobar en un matràs aforat constitueix el seu valor nominal. El valor real del volum d'aquest matràs pot no ser exactament 100,00 mL, però estarà en un interval d'acord amb la seva classe

veracitat de mesura: concordança entre la mitjana d'un nombre infinit de valors mesurats repetits i un valor de referència metrofògic d'una magnitud

verificació: provisió de proves objectives que demostren que una entitat donada satisfà uns requisits determinats

validació: verificació en la qual els requisits especificats són adequats per a un ús determinat

3. Classificació de les pipetes

Al laboratori clínic es treballa principalment amb dos tipus de pipetes: pipetes de vidre i pipetes de pistó. Les darreres s'acostumen a anomenar col·loquialment com «micropipetes» o «pipetes automàtiques».

3.1 Pipetes de vidre

Són cilindres graduats, similars a les buretes, però, a diferència d'aquestes, no es buiden per l'obertura de la clau (o pistó) situada inferiorment, sinó que es buiden quan es deixa entrar aire pel seu extrem superior. Habitualment, s'omplen per aspiració mecànica, que es pot obtenir amb sistemes automatitzats d'aspiració, amb èmbols o amb peres de goma.

Les pipetes de vidre es poden subdividir en:

- **Pipetes graduades:** tenen diferents marques, a volums fixos, fins a un màxim que consta a la pipeta; també consta la resolució, és a dir, el valor de les divisions. Permeten mesurar qualsevol volum inferior o igual al de la seva capacitat màxima (generalment, entre 0,1 mL i 25 mL). En funció del seu sistema de graduació, hi ha diferents tipus:
 - o **Tipus 1:** A l'extrem superior està marcat el zero i la graduació no s'estén fins a l'extrem inferior (no terminal). El volum màxim s'aconsegueix deixant buidar la pipeta només fins a la marca de l'extrem inferior, sense buidar-la del tot (primera pipeta de la Figura 1).
 - o **Tipus 2:** A l'extrem superior està marcat el volum màxim i la graduació arriba fins a l'extrem inferior (terminal). El volum a abocar s'aspira fins a la marca corresponent a aquest volum (que serà a dalt de tot si és el màxim) i es deixa buidar completament, per gravetat, al recipient de destí (tocant la paret interior del recipient, però sense bufar ni forçar la caiguda de les últimes gotes, que han de quedar a la punta cònica de la pipeta) (segona pipeta de la Figura 1).
 - o **Tipus 3:** A l'extrem superior està marcat el zero i la graduació arriba fins a l'extrem inferior (terminal). El volum màxim s'aconsegueix omplint la pipeta fins el zero i després es deixa buidar del tot. Tant en aquesta, com en la de tipus 1, per a volums menors al màxim, s'ha de deixar caure el volum que hi ha entre la marca del zero i la marca del volum desitjat, aturant-se en aquesta (tercera pipeta de la Figura 1).



Figura 1. Tipus de pipetes de vidre.

Les primeres (les de tipus 1, no terminals) s'utilitzarien com les pipetes aforades de doble aforament (o arrasament) que es descriuen a continuació, i les altres dues (de tipus 2 i 3, terminals) com les pipetes d'aforament simple. A la Figura 2 veiem un exemple de l'extrem inferior dels dos casos.

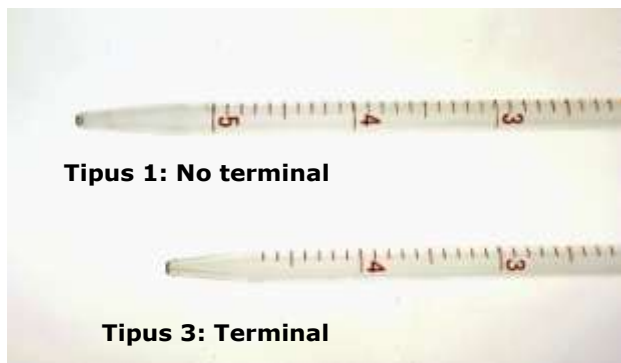


Figura 2. Tipus d'extrems inferiors en pipetes de vidre.

Tradicionalment, les pipetes on la graduació no s'estén fins a l'extrem inferior es poden trobar, en alguns texts, amb la denominació de *pipetes Mohr* i, les pipetes a on l'escala arriba al final, com a *pipetes serològiques*.

- Pipeta aforada: permeten mesurar exactament un volum únic i fix (generalment, entre 0,5 mL i 200 mL). Tenen un bulb a on es recull la major part del volum de líquid i, per sobre i per sota, tenen forma de tub amb una o dues marques (quarta pipeta de la Figura 1). Segons aquestes marques, poden ser:
 - o D'aforament simple: hi ha només una marca d'aforament a l'extrem superior: la pipeta

s'arrasa fins a aquest marca i després es deixa buidar completament.

- o De doble aforament: hi ha una marca d'aforament a cada extrem: la pipeta s'arrasa a la marca d'aforament superior i després es deixa buidar fins que s'arrasa a la marca d'aforament inferior, sense buidar-la del tot.

El volum de les pipetes aforades és fix, mentre que les pipetes graduades estan marcades al llarg del seu cos i es poden utilitzar per abocar volums iguals o menors al nominal.

Hi ha unes pipetes graduades denominades de *blow-out*, en què s'ha de forçar la sortida de la darrera gota. És important conèixer la seva existència per no confondre-les amb les anteriors. De vegades, tenen una banda esmerilada o dues bandes fines al coll; d'altres vegades tenen gravat el terme anglès (Figura 3).



Figura 3. Tipus de colls i gravats en pipetes de vidre.

Hi ha normes que recullen els requisits metrològics i de construcció, tant per a les pipetes graduades destinades a laboratoris generals (5), com per les pipetes aforades de vidre de volum fix (6).

Les pipetes graduades també poden ser de plàstic, d'un sol ús o no, estèrils o no, autoclavables, etc. En alguns casos, porten un petit cotonet a l'extrem superior per evitar l'aspiració accidental de líquid fins a ultrapassar el nivell superior de la pipeta i per evitar la contaminació del líquid que s'està manipulant amb l'aire espirat.

Quan aquestes pipetes graduades s'utilitzen amb un sistema d'aspiració i de buidament automàtic, comunament anomenat *pipetejador*, aquest sistema pot incorporar un filtre, també per prevenir aspiracions i contaminacions accidentals. Generalment, els sistemes automàtics permeten diferents velocitats d'aspiració i dispensació.

3.2 Pipetes de pistó (o d'èmbol)

Són les que utilitzen un èmbol per aspirar i abocar el líquid. Estan compostes d'un cos en el qual s'acobla un sistema pistó-cilindre; en aquest últim s'ajusta una punta substituïble —habitualment de plàstic però en alguns casos de vidre— i un mecanisme per a la seva expulsió. El pistó es pot desplaçar en un recorregut fins a un topall superior, per aspirar el líquid, i fins a un topall inferior (doble), per buidar-lo. El recorregut del pistó determina el volum aspirat i dispensat; pot ser fix, o bé graduable dintre d'un interval de volum especificat.

El pistó o èmbol pot entrar en contacte amb el líquid o no; en funció d'això, les pipetes de pistó poden ser:

- De desplaçament d'aire (tipus A): queda un volum d'aire entre el pistó i la superfície del líquid. Són les més utilitzades al laboratori clínic; a la Figura 4, les imatges A i B mostren una pipeta de volum fix i una de volum variable d'aquest tipus.
- De desplaçament positiu o directe (tipus D): el pistó contacta directament amb el líquid. En aquestes pipetes, la punta acostuma a ser de tipus capil·lar.

Dintre de les pipetes de pistó amb desplaçament d'aire, hi ha un tipus en què s'aspira i es dispensa a través de diversos sistemes pistó-cilindre cada cop que es pipeteja. Són les anomenades *pipetes multicanal*.

El nombre de canals acostuma a ser 8 o 12 (que correspon al nombre habitual de pous de les plaques estàndard d'enzimoinmunoanàlisi), però actualment hi ha de 6 o d'altre nombre de canals i, també molt important, hi ha models que permeten ajustar la distància entre canals. Podem veure un exemple de pipeta multicanal a la imatge C de la Figura 4. El volum nominal d'aquestes pipetes també pot ser fix o variable, i poden ser manuals o electròniques.

Hi ha un altre tipus particular, també dintre de les pipetes de pistó amb desplaçament d'aire, en el qual es permet l'aspiració d'un volum gran de líquid i la dispensació repetida d'un volum determinat d'aquest líquid, no tornant a aspirar de nou fins que es buida. Aquestes pipetes s'anomenen *pipetes repetidores* o *pipetes de repetició*. En general acostumen a poder abocar més d'un volum fix, i utilitzen puntes tipus xeringa. La combinació entre varis tipus de xeringa de volums diferents i vàries posicions de dispensació fixes possibles dona el conjunt de volums finals de dispensació possibles. Aquestes pipetes també poden ser manuals (com la de la imatge D de la Figura 4) o electròniques.



Figura 4. Tipus de pipetes de pistó (o d'èmbol).

4. Utilització de les pipetes

4.1 Informació general

Hi ha un seguit de consideracions generals d'ús, que s'han d'especificar pel fabricant, entre les quals destaquen:

- la possibilitat d'esterilització i les seves condicions (autoclau o altres sistemes),
- la resistència química als diferents líquids,
- la possibilitat que la pipeta contami ni el líquid que aboca,

Per a les pipetes de pistó, a més, els aspectes següents:

- la llista de possibles puntes (amb les referències de producte) que el fabricant recomana per al seu ús,
- la resistència a l'exposició a les radiacions ultraviolades, si s'utilitzen en genètica molecular,
- el desmuntatge per a la seva neteja i descontaminació (biològica, radioactiva, etc.),

També s'ha de saber si la pipeta pot ser sotmesa al tractament per calor que s'utilitza habitualment per destruir les ribonucleases (més llarg i a més temperatura que amb l'autoclau), necessari en alguns laboratoris de genètica molecular. En aquest darrer ús, les pipetes de pistó s'acostumen a utilitzar amb puntes lliures de ribonucleases. En aquests laboratoris, també s'utilitzen habitualment puntes amb filtre, per evitar el pas accidental de quantitats mínimes de mostra —o del seu producte de reacció— al sistema pistó-cilindre durant l'aspiració, i la contaminació encreuada de les mostres.

4.2 Informació específica

La informació que consta en cada pipeta depèn del seu tipus. Pel que fa a les pipetes de vidre, sol constar: el volum (per a les pipetes aforades de

volum fix, el volum nominal; per a les pipetes graduades, el volum nominal màxim i el volum entre les marques de divisió); la classe (A, B, ..., que tractarem més endavant); el fabricant i la temperatura a la qual són vàlides les especificacions de volum (habitualment 20 °C). Les especificacions més detallades es recullen a les normes UNE-EN ISO 648 i 835, per a pipetes aforades i graduades, respectivament.

Per a les pipetes de pistó es fa constar el volum nominal, si són de volum fix, i l'interval de mesura, si són de volum variable. Hi ha també pipetes amb tres volums concrets possibles, que el fabricant fa constar i que l'usuari pot seleccionar. En les pipetes de volum variable, el volum nominal és el volum més gran que l'usuari pot ajustar i que ve definit pel fabricant.

Les pipetes de repetició acostumen a tenir una taula que mostra, per a cada combinació de posició i de punta utilitzables, el volum abocat en cada repetició i el nombre màxim de repeticions possibles amb la mateixa aspiració.

4.3 Procediment per pipetejar

Pipetes de vidre

Per a les pipetes de vidre graduades, el procediment per pipetejar variarà segons siguin de tipus 1, 2 o 3. En qualsevol cas, tant per a aquestes com per a les aforades, i fent servir sistemes mecànics o electrònics, s'omple la pipeta fins el volum desitjat i es deixa buidar al recipient de destí, bé fins a la marca corresponent, o bé en la seva totalitat (per gravetat), tal i com ja s'ha dit.

L'única consideració especial és la lectura del nivell del líquid, però també s'han de recordar els aspectes següents:

- sempre utilitzar pipetes de classe A amb preferència a les de classe B (vegeu l'apartat de propietats metroològiques),
- per a les pipetes de buidat total, deixar passar 15 segons un cop hagi caigut tot el líquid, per a les pipetes normals (de classe A o B), i 5 segons per les marcades "S" (de classe AS), abans de retirar-la del recipient,
- vigilar la lectura del menisc del líquid considerant que:
 - o per a líquids transparents, es llegeix la part inferior del menisc (imatge A de la Figura 5),
 - o per a líquids opacs, es llegeix la part superior de la columna de líquid (imatge B de la Figura 5),
 - o l'ull ha d'estar al nivell del menisc (evitar error de paral·laxi),
 - o la temperatura del líquid ha de ser propera a la del calibratge (que declara el fabricant),
 - o per a líquids que fan meniscs convexes (com el mercuri), es llegeix la part superior del menisc.

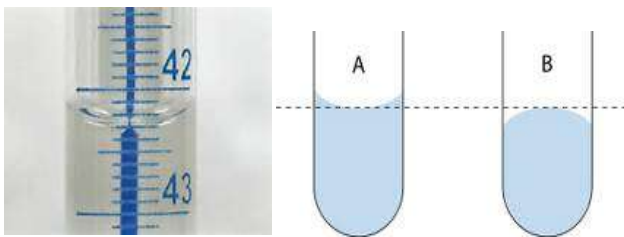


Figura 5. Tipus de meniscs que poden observarse en les pipetes de vidre com a conseqüència de la utilització de diferents tipus de líquids.

Pipetes de pistó

Tot seguit es tractarà amb extensió el procediment per pipetejar amb a les pipetes de pistó amb interfase d'aire (col·loquialment, *pipetes automàtiques* o

micropipetes), que acostumen a ser les més utilitzades als laboratoris clínics. A més de les normes citades d'aplicació específica per al maneig de pipetes, alguns fabricants proporcionen recomanacions específiques per al seu ús.

El procediment recomanat per a l'ús de les pipetes de pistó amb interfase d'aire és:

- assegurar-se que la pipeta està en disponibilitat de ser utilitzada (neta, calibrada, etc.);
- fixar el volum desitjat, per a les pipetes de volum variable, o revisar si és del volum adient, per a les pipetes de volum fix;
- col·locar la punta seleccionada, assegurant-se que la pressió amb el cilindre on s'encaixa és ferm, regular en tota la superfície de contacte i que la punta està perfectament perpendicular al cos de la pipeta;
- baixar l'èmbol suaument fins arribar al primer topall;
- submergir la punta de 2 a 4 mm per sota del nivell del líquid i deixar anar l'èmbol poc a poc (torna a la seva posició inicial perquè té una molla), aspirant el líquid; assegurar-se que la pipeta està en posició vertical i que no hi ha bombolles d'aire al líquid que omple la punta;
- quan el volum hagi arribat al màxim, esperar un segon;
- posar la pipeta en el recipient a on es vol passar el líquid, inclinar lleugerament la pipeta (10° a 45° respecte a la paret del recipient) i prémer de nou l'èmbol fins al primer topall, deixeu transcórrer un segon i acabeu de prémer d'èmbol fins al segon topall, la qual cosa permet acabar de buidar la punta, si cal;

- eliminar la punta al recipient adient, pressionant la peça extractora, habitualment situada al costat de l'èmbol (o manualment, si no es disposa d'aquesta peça).

Consideracions particulars:

- En algunes pipetes de volum variable, la mateixa peça que fa d'èmbol és la que permet seleccionar el volum; en aquests casos, hi ha un mecanisme de bloqueig i s'ha d'assegurar que el volum seleccionat s'ha quedat fixat amb aquest mecanisme, abans d'iniciar l'aspiració de mostra, per tal que el volum no variï mentre es pipeteja.
- S'ha de seleccionar la pipeta de volum variable que tingui un volum nominal més proper al volum que s'ha d'abocar, perquè això disminueix l'error de mesura. Per exemple, si es disposa d'una pipeta de 100 μL i una altra de 200 μL , per abocar un volum de 80 μL , s'utilitzarà preferentment la primera.
- Les pipetes de volum variable acostumen a expressar el volum en microlitres (μL) però, en alguns casos (especialment per a les pipetes de 1000 μL), s'omet l'últim zero, de manera que a la finestra on apareix el volum a què està ajustada es visualitza "100", quan abocarà 1000 μL . Pel contrari, en algunes pipetes que aboquen volums menors a aquest (per exemple de 100 o 200 μL), a la finestra apareixen un o més decimals de μL , de manera que mostrarà "100 0" (l'últim "0" separat per una línia vertical), quan aboqui 100 μL .
- Per les pipetes de volum variable, en cap cas s'ha d'excedir el volum nominal que declara el fabricant.
- Per ajustar el volum desitjat, alguns fabricants recomanen passar tres punts del volum desitjat (generalment, 3 o 30 μL , segons el volum nominal), sempre sense excedir aquest volum nominal, i tornar a baixar aquests tres punts fins el volum desitjat.
- En el cas de líquids molt viscosos, s'ha de pipetejar més lentament. En cas de líquids molt poc viscosos, per omplir la punta bé, s'ha d'aspirar i deixar anar més d'un cop el volum desitjat perquè aquesta s'impregni i es mulli adequadament. Quan s'hagi aspirat el volum de forma correcta, s'ha de transferir al recipient corresponent de forma relativament ràpida, per evitar que regalimi punta avall. Alguns fabricants recomanen "prehumitejar" les puntes en tots els casos. Hi ha una forma de pipetejar, denominada *inversa*, que alguns fabricants recomanen per a líquids molt viscosos o volàtils.
- Si han quedat gotes a l'exterior de la punta, s'han d'eixugar abans de buidar el seu contingut al recipient.
- S'ha d'assegurar que la punta ha quedat totalment buida de líquid; en cas contrari es pot pipetejar repetidament aire fins arrossegar les gotes que hagin pogut quedar a l'interior de la punta; també es pot pipetejar sobre la interfase líquid-aire o sobre les parets del recipient, de manera que la tensió superficial afavoreixi el buidament. Si al recipient hi ha líquid, es pot tornar a aspirar i abocar aquest mateix, per arrossegar les gotes de les parets de la punta.
- En cas d'aspiració involuntària de líquid a l'interior del cilindre del cos de la pipeta, més enllà de la punta, mai continuar treballant i

sempre netejar-la de seguida, desmuntant el mecanisme d'aspiració-dispensació.

4.4 Errors més freqüents

A banda de mals funcionaments de tipus mecànic o calibratges dolents, les accions associades al procediment per pipetejar que més poden repercutir sobre l'exactitud del volum dispensat són:

- immersió massa profunda de la punta en la solució;
- inclinació de la pipeta durant l'aspiració;
- aspiració d'aire durant l'emplenament;
- deixar restes de líquid després de buidar (malament) la punta;
- utilització de puntes inadequades que no ajustin fermament i homogeneïta al cilindre.

5. Aspectes metrològics: descripció i estimació

Com qualsevol altra sistema de mesura del laboratori clínic, les pipetes proporcionen valors mesurats amb una incertesa de mesura (6); Per a les pipetes de pistó, el proveïdor dóna els valors màxims teòrics tant per al biaix com per a la imprecisió de les seves pipetes, per a uns volums d'abocament i unes condicions determinades (quan s'utilitzen amb aigua destil·lada i a 20 °C). També pot donar l'error de mesura màxim permès, expressat en valor absolut (volum en µL) o relatiu (percentatge). Per a les pipetes de volum variable, el valor de l'error de mesura màxim permès dels seus resultats és el que té per al seu valor nominal.

Pel que fa a les pipetes de vidre (com d'altres materials volumètrics de vidre), es poden agrupar en diverses classes: classe A (o AS), B, C, en funció de la seva *tolerància* o interval de valors definit en les

especificacions. Aquesta tolerància és més petita per a les pipetes de classe A, tant per al volum nominal com per a les divisions en el cas de pipetes graduades, i té uns valors que estan normalitzats. Les pipetes de classe B tenen toleràncies aproximadament del doble que les fixades per les normes per a la classe A/AS.

- La classe de la pipeta acostuma a estar marcada al vidre.
- En les pipetes de classe A/AS, estan marcats els valors de la tolerància, expressats en valor absolut, precedit per signe « ± » (4). Per exemple, una pipeta aforada de classe A amb un valor nominal de 10 mL, ha de tenir una tolerància de 0,02 mL; això vol dir que el volum real que dispensi aquesta pipeta estarà dins l'interval de 9,98 mL a 10,02 mL.
- El fabricant ha d'indicar les condicions de calibratge per al seu ús previst, que poden ser TC (de l'anglès *to contain*), TD (de l'anglès *to deliver*) o bé ambdues utilitzacions alhora. Les pipetes TC estan calibrades perquè la línia d'aforament indiqui el volum contingut, mentre que en les pipetes TD indica el volum abocat. La diferència està en el líquid que mulla la paret interna de la pipeta i que no es buida. La denominació ISO per a TC és «IN» i, per a TD, és «EX» .
- La norma ISO 1769 estableix un codi de colors en funció del volum nominal.

A la Figura 6 es mostren algunes de les informacions que han de constar a les pipetes de vidre normalitzades, graduades o aforades.

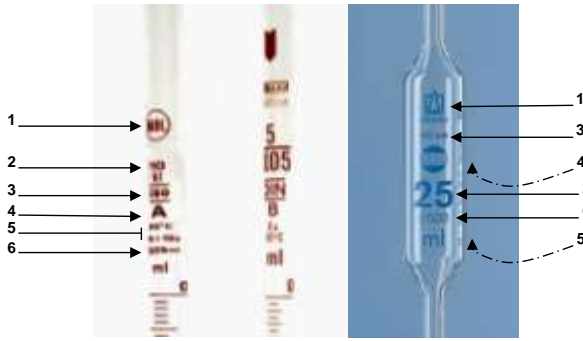


Figura 6. Informació que ha de constar en una pipeta de vidre: 1) Marca del fabricant; 2) Volum nominal; per a les graduades, a sota consta la resolució; 3) Normes a què s'acull (ISO, EN, UNE); 4) Classe (A, B, AS...); 5) Temperatura de referència (20 °C), temps d'espera (5 s, 15 s), tipus de calibratge per a l'ús previst (EX); 6) Tolerància.

6. Calibratge i verificació

En la majoria de laboratoris clínics, s'acostuma a parlar de *calibratge* de les pipetes de laboratori, quan, segons la definició del Vocabulari Internacional de Metrologia, realment s'està realitzant la primera etapa del calibratge, és a dir «s'estableix una relació entre els valors (...) obtinguts mitjançant uns patrons i les indicacions corresponents».

En un calibratge complet hi hauria una segona etapa, en que “la informació obtinguda s'utilitza per establir una relació que permet obtenir un resultat de mesura a partir d'una indicació”. Aquesta segona part no s'aplica. Més aviat, si s'ha excedit l'error de mesura màxim permès, s'acostuma a corregir les causes (generalment, ajustant l'èmbol si és una pipeta de pistó) i tornar a fer la *verificació* fins a situar la pipeta en condicions de treball que no superin aquest error màxim permès (en lloc de corregir els volums a abocar en funció dels resultats del calibratge).

Tot i això, com passa també amb altres definicions, la norma UNE-EN ISO 8655 fa una adaptació de la definició del Vocabulari Internacional de Metrologia i defineix *calibratge* per a aparells volumètrics accionats amb pistó com el «conjunt d'operacions que estableixen la relació entre el volum dispensat i el

volum nominal o seleccionat corresponent de l'aparell» (3). Així doncs, als laboratoris clínics s'acostuma a usar el terme «calibratge d'una pipeta» per referir-se a aquesta accepció. Això correspondria més a una verificació, amb la que s'està estimant realment l'error de mesura d'una pipeta, i el resultat obtingut es compara amb l'error de mesura màxim permès que el laboratori tingui establert per a un determinat ús o un determinat volum. Fet aquest aclariment, en endavant, parlarem de *calibratge* per ser el terme més sovint utilitzat.

En la major part de laboratoris clínics, el calibratge només s'aplica a les pipetes de pistó, i no a les de vidre, en les que s'entén que continuen calibrades mentre no s'incompleixin les recomanacions del fabricant.

Per a les pipetes de pistó, el calibratge es recomana en els casos següents:

- De manera sistemàtica: la periodicitat mínima indicada per la norma ISO 8655-1 és anual, tot i que es poden calibrar més freqüentment en funció de les condicions i requeriments de l'ús.
- Després de neteges internes, avaries o substitució d'algun component. També seria recomanable calibrar una pipeta si aquesta cau al terra.
- Si els resultats de control o dels mesuraments pels quals s'utilitza la pipeta fan sospitar un mal funcionament.

Per determinar el volum real abocat, s'han utilitzat tradicionalment mètodes gravimètrics (per pesada), és a dir, pesant el volum d'aigua dispensat per a un volum teòric (nominal). Alternativament, també es pot fer per altres mètodes, com ara espectromètrics, o per combinacions dels dos. La norma UNE-EN

ISO 8655-6 (3) recull els requisits per realitzar el primer procés i la norma UNE-EN ISO 8655-7 (8), per al segon.

A més, per a aquells laboratoris clínics que estiguin acreditats per la norma UNE-EN ISO 15189 (9), és d'aplicació el document d'ENAC CGA-ENAC-LCL (10), on diu expressament:

Los equipos utilizados para realizar las pruebas o mediciones secundarias (por ejemplo material volumétrico) que tengan un efecto significativo en la exactitud o validez de los resultados de las pruebas, deben ser calibrados antes de su puesta en funcionamiento, garantizando la trazabilidad de las medidas realizadas en el laboratorio a patrones nacionales o internacionales o a unidades de medida del SI. Los certificados de calibración externa deberán haber sido emitidos por laboratorios de calibración acreditados por ENAC o por cualquier organismo de acreditación con que ENAC haya firmado un acuerdo de reconocimiento (EA, ILAC, ...) o por laboratorios nacionales participantes en las intercomparaciones aceptadas por el BIPM en cada área en cuestión.

D'altra banda, els laboratoris de calibratge, per tal d'oferir calibratges acreditats, s'han d'haver acreditat per ENAC segons la norma UNE-EN ISO 17025 (11).

La Societat Espanyola de Bioquímica Clínica i Patologia Molecular ha publicat un document que recull les recomanacions per al calibratge de material volumètric al laboratori clínic i també com estimar la incertesa de mesura en les pipetes de laboratori (12). També hi ha normes ISO que recullen com estimar aquesta incertesa per a les mesures de volum utilitzant el mètode gravimètric (13) o espectromètric (14) i, com a document de referència en el càlcul de

la incertesa de la mesura, es pot utilitzar el document elaborat pel Comitè Conjunt de Guies de Treball en Metrologia (JCGM 100), editat pel Centre Espanyol de Metrologia (7).

6.1 Mètode gravimètric

Si el calibratge es realitza mitjançant un mètode gravimètric, el procés es pot resumir en els aspectes següents:

- La balança utilitzada ha d'estar calibrada de forma periòdica amb un patró traçable i tenir una incertesa de mesura màxima que variarà segons quin sigui el volum que es vulgui verificar, segons les corresponents normatives (per exemple, per a un volum d'1 µL, serà de 0,002 mg, i per a un volum de 1000 µL, de 0,2 mg).
- La sala o el laboratori a on es faci l'estudi ha de reunir unes característiques determinades d'humitat, temperatura, pressió baromètrica i d'absència de vibracions i de corrents d'aire. Els instruments per determinar la humitat, la pressió i la temperatura també han d'estar calibrats de manera traçable i han de permetre una exactitud respectivament de 10%, 1 kPa i 0,2 °C.
- L'aigua utilitzada ha de ser destil·lada o desionitzada com a mínim de tipus III,
- Els volums a què es realitza la verificació són, si la pipeta és de volum fix: el valor nominal i, si és variable: el valor nominal (el màxim), el mínim i un valor intermedi. Per a volums menors a 50 µL, s'ha de prevenir o corregir l'evaporació.
- El procediment es resumeix en les passes següents:

- Col·locar el recipient adient al plat de la balança,
- Tarar la balança, anotant el valor de tara obtingut,
- Abocar un volum d'aigua destil·lada corresponent al volum nominal que es vol comprovar, i anotar el pes obtingut,
- Repetir l'operació 10 vegades, idealment, en menys de 60 segons.

Aquest procediment s'ha de repetir per als diferents volums desitjats de treball de la pipeta, tal i com s'ha dit, el valor nominal, mínim i intermedi, però això es pot adaptar a l'ús habitual de la pipeta.

Per a les pipetes multicanal, s'ha de repetir tota l'operació per a cadascun dels canals.

- Si s'escau, es realitzen les correccions corresponents a la pressió i temperatura, utilitzant taules o factors de conversió publicats. Per a volums petits, l'evaporació és una font important d'error i es pot també haver de corregir.
- Es calculen els resultats obtinguts per a cada volum estudiat:
 - Estimar l'error sistemàtic relatiu, calculant el biaix: valor mitjà dels 10 valors observats menys el valor nominal, dividit pel valor nominal, per cent,

$$\delta_r = \left(\frac{\bar{V}_i - V_n}{V_n} \right) \cdot 100$$

- Estimar la imprecisió, calculant la desviació estàndard dels 10 valors obtinguts,

$$s_i = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (V_i - \bar{V}_i)^2}{n-1}}$$

- Estimar la incertesa de mesura u , utilitzant la fórmula simplificada, a partir dels dos anteriors: seguint l'ISO 8655-6, se suma l'error sistemàtic relatiu i la desviació estàndard per a un factor de cobertura de 2, que equival a un nivell de confiança del 95%:

$$u = |\delta_r| + 2s_i$$

- Si es tracta de volums molt petits o a on es requereix d'una exactitud molt alta, s'ha de fer una estimació completa de la incertesa relativa combinada, considerant tots els factors que poden afectar, per exemple, seguint l'ISO 20461.

6.2 Mètodes no gravimètrics

Alternativament al mètode gravimètric, hi ha altres mètodes: uns espectromètrics que observen el canvi d'absorbància produït per la reacció que té lloc per l'addició d'un volum teòric d'una solució de calibratge a un blanc, o bé d'altres titrimètrics, que observen el canvi en el pH, també a conseqüència de l'addició d'un volum teòric a una solució.

Els primers estan disponibles comercialment des de fa més d'una dècada i aquests mètodes alternatius estan contemplats en l'ISO 8655-7; a més ofereixen en alguns casos traçabilitat a estàndards internacionals i es poden utilitzar també per a pipetes multicanal o per a sistemes automatitzats. Al nostre país encara no estan massa introduïts ni comercialitzats.

7. Manteniment

Les pipetes de laboratori s'han de sotmetre, a més del calibratge, a un manteniment preventiu, que ha d'incloure les accions següents:

- Neteja: de la superfície i sempre que al cilindre interior hagi pogut entrar part de la mostra; el fabricant dóna instruccions sobre si es pot netejar amb aigua, sabó, isopropanol, etc. Generalment, requereix del desmuntatge de la peça ejectora de la punta.
- Lubrificació: del sistema de lliscament del pistó, amb oli de silicona.
- Revisió i reposició de la junta de goma, si s'escau.

El manteniment preventiu el pot realitzar el propi personal del laboratori clínic o bé el personal de l'empresa proveïdora d'altres manteniments o calibratges.

D'igual manera que per al calibratge, seran el tipus i la freqüència d'ús de la pipeta, juntament amb la necessitat d'exactitud de l'activitat del laboratori, els que determinin la freqüència i tipus de manteniments.

Bibliografia

1. Asociación Española de Normalización y Certificación. Aparatos volumétricos accionados mediante pistón — Parte 1: Terminología, requisitos generales y recomendaciones de uso (UNE-EN ISO 8655-1:2003). Madrid: AENOR; 2003.
2. Asociación Española de Normalización y Certificación. Aparatos volumétricos accionados mediante pistón — Parte 2: Pipetas tipo pistón (UNE-EN ISO 8655-2:2003). Madrid: AENOR; 2003.
3. Asociación Española de Normalización y Certificación. Aparatos volumétricos accionados mediante pistón — Parte 6: Métodos gravimétricos para la determinación del error de medición (UNE-EN ISO 8655-6:2003). Madrid: AENOR; 2003.
4. Comissió Electrotècnica Internacional, Cooperació Internacional per a l'Acreditació de Laboratoris, Federació Internacional de Química Clínica, Oficina Internacional de Pesos i Mesures, Organització Internacional de Metrologia Legal, Organització Internacional de Normalització, Unió Internacional de Física Pura i Aplicada, Unió Internacional de Química Pura i Aplicada. Vocabulari internacional de metrologia. Conceptes fonamentals i generals i termes associats. (VIM). 3a edició. 2008. <<http://www.acclcat.com/continguts/ivv114.pdf>> (accés: 2013-07-02).
5. Asociación Española de Normalización y Certificación. Material de vidrio para laboratorio. Pipetas graduadas (UNE-EN ISO 835:2007). Madrid: AENOR; 2007.
6. Asociación Española de Normalización y Certificación. Material de vidrio para laboratorio. Pipetas de uno o dos aforos de volumen fijo (UNE-EN ISO 648:2008). Madrid: AENOR; 2009.
7. International Organization for Standardization, International Electrotechnical Commission, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, International Laboratory Accreditation Cooperation, International Organization of Legal Metrology, International Bureau of Weights and Measures, International Union of Pure and Applied Chemistry, International Union of Pure and Applied Physics. Guide to the expression of uncertainty in measurement. Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement. JCGM 100:2008. <http://www.bipm.org/utls/common/documents/jcgm/JCGM_100_2008_E.pdf> (Accés 2013-07-02).
8. Asociación Española de Normalización y Certificación. Aparatos volumétricos accionados mediante pistón — Parte 7: Métodos no gravimétricos para la evaluación de la aptitud al uso de los equipos (UNE-EN ISO 8655-7:2006). Madrid: AENOR; 2006.

9. International Organization for Standardization. Medical laboratories — particular requirements for quality and competence. ISO 15189. Geneva: ISO; 2012.
10. Entidad Nacional de Acreditación. Criterios generales de acreditación de laboratorios clínicos. CGA-ENAC-LCL. Madrid: ENAC; Marzo 2008. <<http://www.enac.es/documents/enac/documentos/Criterios%20Generales%20de%20acreditación/CGA-ENAC%20LCL.pdf>> (Accés 2013-07-02).
11. Asociación Española de Normalización y Certificación. Evaluación de la conformidad. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración (UNE-EN ISO 17025:2005). Madrid: AENOR; 2005.
12. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Recomendaciones para la calibración de material volumétrico en el laboratorio clínico. [Preparat per Ruíz Morer R.]. Barcelona: Publicaciones Nacionales Técnicas y Extranjeras; 2009. [B-33169/09] [ISSN: 2013-5750].
13. International Organization for Standardization. Determination of uncertainty for volume measurements made using the gravimetric method. ISO/TR 20461. Geneva: ISO; 2000.
14. International Organization for Standardization. Piston-operated volumetric instruments — Determination of uncertainty for volume measurements made using the photometric method. ISO/TR 16153. Geneva: ISO; 2004.