

Evaluación de un método enzimático para la determinación de triglicéridos

YARIMA VELÁSQUEZ¹, NORYS RODRÍGUEZ¹, XITLALÍ MUJICA², GLADYS SANTIAGO²,
SOLMARÍA VIVAS², CARMEN LABRADOR², EYILDA GONZÁLEZ¹, AIDA LORENTE¹.

*Grupo de Investigación en Aseguramiento de la Calidad y Análisis Clínicos¹.
Bioquímica Clínica². Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes.
Campo de Oro. Mérida-Venezuela. giacac@ula.ve¹*

Recibido Junio 2006 - Aceptado Enero 2007

RESUMEN

A fin de evaluar la confiabilidad del método enzimático de Laboratorios Heiga para la cuantificación de triglicéridos (Reactivo Ref. 880-L) se efectuó un estudio de precisión y exactitud con ensayos de control: CB, CN y CA ("Control Bajo", "Control Normal" y "Control Alto", respectivamente); y ensayos de control con valor asignado (CVA). La precisión intralaboratorio fue determinada con el coeficiente de variación (CV) mientras que la Desviación Estándar Obtenida (DEO) fue usada para la precisión interlaboratorio y la exactitud la cual, además, fue evaluada con ensayos de mezcla (M), recuperación media (RM) y Recuperación Alta (RA). Por otra parte, se efectuó un estudio de linealidad y sensibilidad con estándares de concentración baja, media y alta, aplicando la ecuación de la recta por el método de los mínimos cuadrados para determinar el intervalo de linealidad; así como el cálculo de la pendiente y la prueba de la t ($p < 0,05$) entre los estándares con menor diferencia de concentración entre sí, para la sensibilidad. Los CV resultaron entre 2,01% y 9,33% y las DEO entre -0,19 y 1,74; los porcentajes de recuperación de 98,82%, 99,61 y 102,93% para M, RM y RA, respectivamente; encontrándose todos dentro de los rangos de aceptabilidad. La proporcionalidad resultó entre 0 y 1000 mg/dL, la pendiente fue mayor a 45 grados y la diferencia de medias estadísticamente significativa ($p = 0,05$) entre los estándares de 40 y 50 mg/dL. Se concluyó que el método presenta precisión intralaboratorio e interlaboratorio para niveles bajos, normales y altos del analito, exactitud, buena sensibilidad y linealidad hasta 1000 mg/dL.

PALABRAS CLAVES

Confiabilidad, precisión, exactitud, linealidad, sensibilidad.

ABSTRACT

In order to evaluate the reliability of the enzymatic method to determine triglycerides (Ref. 880-L reactive) from Laboratorios Heiga, a study of the precision and the accuracy was carried out with control assays: CB, CN and CA ("Low Control", "Normal Control" and "High Control", respectively); and value assigned control assays (CVA). The intra laboratory precision was determined with the Variation Coefficient (CV) whereas the Obtained Standard Deviation (DEO) was used to evaluate the inter laboratory precision and accuracy, which was also evaluated employing medley assays and intermediate and high recovery assays (RM and RA). Studies of the linearity and sensitivity were also performed using low, intermediate and high concentration standards; the straight line equation by the method of the square minimum was applied to determine the linearity range; and the calculation of the slope and the t student test ($p < 0,05$) between very close concentration standards in order to verify sensitivity. The CV were between 2,01% and 9,33%, the DEO between -0,19 and 1,74 and the percents of the recovery were on 98,82%, 99,61% and 102,93% for M, RM y RA, respectively; all of them were within the acceptability limits. There was proportionality between 0 and 1000 mg/dL, the slope was greater than 45 degrees and the test between standards with 40 and 50 mg/dL resulted significant. It was concluded that the method shows intra and inter laboratory precision for low, normal and high concentrations of the analyte, accuracy, good sensitivity and linearity up 1000 mg/dL.

KEY WORDS:

Reliability, precision, accuracy, sensitivity, linearity.

INTRODUCCIÓN

La determinación de triglicéridos es útil en el diagnóstico de las dislipidemias y en el contexto de una actitud preventiva de lesiones ateroscleróticas (Schreier y col., 2001) y por tanto de posibles eventos isquémicos (Immanuel et al, 2006). Para dicha determinación se han utilizado diversos métodos a través de los años, entre ellos: el método de sustracción, método manual directo y métodos con determinación de glicerol (Naito, 1990).

En cuanto a los métodos con determinación del glicerol, el triglicérido es hidrolizado para remover los ácidos grasos y así determinar el glicerol libre, cuya concentración es equivalente a la del triglicérido, para ello se utilizan técnicas químicas y enzimáticas (Naito, 1990).

Las técnicas químicas requieren tratamiento previo de la muestra para separar los lípidos de las proteínas, realizándose en cuatro etapas: extracción de triglicéridos y eliminación de sustancias interferentes, saponificación de los triglicéridos a glicerol y ácidos grasos, oxidación del glicerol a formaldehído y medición del formaldehído (Naito, 1990; Salve et al., 1994).

Por su parte, las determinaciones enzimáticas se realizan en el glicerol contenido en las moléculas de triglicéridos luego de una hidrólisis química o enzimática (lipasas combinadas con proteasas) para remover ácidos grasos, prefiriéndose estas últimas por ser una técnica directa, rápida y específica (Naito, 1990) con mediciones por pruebas ópticas, lo que le confiere especificidad y sensibilidad (Richterich y Colombo, 1983). Dentro de estas determinaciones existen diversos métodos: de Bucolo y David, de Megraw, de Nagele y col (Naito, 1990). Este último emplea el acoplamiento de las enzimas lipasa (que hidroliza los triglicéridos a glicerol y ácidos grasos), glicerol quinasa (la cual fosforila al glicerol, formando glicerol 1-fosfato), glicerol fosfato oxidasa (quien oxida al glicerol 1-fosfato, formando dihidroxiacetona-fosfato y peróxido de hidrógeno) y la peroxidasa (que en presencia de la 4-aminofenazona forma una quinona de color rosado a partir del peróxido de hidrógeno) (Naito, 1990). Este método ha sido adaptado por las casas comerciales: WIENER LAB. (2002), HUMAN (2000), STANBIO Laboratory (2006), INVELAB S.A. (2006) y Laboratorios HEIGA C.A. (2000); la cual ha planteado la necesidad de evaluar la confiabilidad del mismo en su reactivo Ref. 880-L.

Dicha confiabilidad es la capacidad para determinar un analito proporcionando resultados idóneos (Boquet et al., 1996); para alcanzarla, el método debe poseer: exactitud, precisión, sensibilidad, especificidad (González, 1993; Kerrigan y Brooks, 1998), linealidad

(Baffi, 1997; Carey y Garber, 1990; González, 1993) y paralelismo (González, 1993; Kertesz et al., 1998).

Siendo la exactitud la concordancia aproximada entre el valor obtenido en una medición y la cantidad realmente existente en el material examinado (Boquet et al., 1996; Baffi, 1997; Repetto, 2005), mientras que la precisión consiste en la concordancia entre una serie de mediciones obtenidas en múltiples pruebas bajo las mismas condiciones (Baffi, 1997; Repetto, 2005).

Por su parte, la sensibilidad es la capacidad para detectar pequeñas variaciones de concentración del componente que se ha de medir (Cortes et al, 1994); la especificidad es la capacidad para determinar únicamente tal componente (Cortes et al, 1994; Repetto, 2005); la linealidad es definida como el intervalo de proporcionalidad entre la concentración del analito que el método valora y la unidad de medida en la que éste se basa (Carey y Garber, 1990; Repetto, 2005) y el paralelismo es la capacidad para mantener la linealidad, aún cuando se diluya la muestra (González, 1993).

Debido a que los métodos enzimáticos han mostrado positividad para estos parámetros (Naito, 1990; Richterich y Colombo, 1983), es posible que el método de Laboratorios Heiga presente buena precisión, exactitud, linealidad y sensibilidad. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar estos parámetros, a fin de informar a dicha casa comercial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para llevar a cabo la evaluación del método enzimático de Laboratorios Heiga para la determinación de triglicéridos, se efectuó un estudio de precisión, exactitud, linealidad y sensibilidad, tal como se describe a continuación:

Precisión y exactitud:

Se realizaron 20 determinaciones consecutivas de triglicéridos con el reactivo Ref. 880-L de Laboratorios Heiga, C. A. en alícuotas de controles de concentración inferior (CB), dentro (CN) y superior (CA) al rango de referencia del analito (hombres: 60 - 165 mg/dL y mujeres: 40 - 140 mg/dL) y 30 determinaciones en un suero control con valor asignado (CVA) mediante el Programa de Evaluación Externa de la Calidad (PEEC) de la Fundación Bioquímica Argentina (FBA). Todos liofilizados y de origen humano; correspondiendo CB a pathonorm low lote MR9077, CN a lote 002UN; CA al pathonorm high lote 004UE y CVA al lote 348 del PEEC de la FBA, los cuales fueron reconstituidos y preservados según las indicaciones de los fabricantes.

Con los resultados obtenidos se determinó la precisión intralaboratorio (interensayo) con el

Coefficiente de Variación [$CV=(DE \times 100)/VO$] y la precisión interlaboratorio, así como la exactitud con la Desviación Estándar Obtenida [$DEO=(VE-VO)/DEE$], donde: DE= Desviación estándar, VO= Valor obtenido (media de los resultados para el CV y DEO interensayo o el valor individual de cada determinación para la DEO intraensayo), VE es el valor esperado (comercial o asignado, según el suero) y DEE un 5% del VE. Considerándose como precisión intralaboratorio satisfactoria valores de CV menores o iguales a 10% y como precisión interlaboratorio valores de DEO menores o iguales a ± 2 .

La exactitud fue también evaluada mediante la prueba de la adición (porcentaje de recuperación) y la prueba de la mezcla. Para la prueba de adición se realizaron 20 ensayos consecutivos de recuperación media (RM) y alta (RA), en donde se agregó al CN 100 mg de triglicéridos (5 μ l de un patrón de triglicéridos de 200 mg/dL) y 200 mg de triglicéridos (10 μ l de un patrón de triglicéridos de 200 mg/dL), respectivamente; verificando también la precisión de éstos ensayos con el CV. Para la prueba de la mezcla se procesaron 20 ensayos M en los cuales se agregó 5 μ l de CB y 5 μ l de CA en lugar de la muestra. Procediéndose a obtener el porcentaje de recuperación [$\%R= (VO \times 100)/VE$], mediante la comparación de la media de los valores experimentales de M, RM o RA (VO) con los valores nominales (VE) del CN al sumarle la cantidad añadida (para RM y RA) o de la media de los sueros mezclados (para M). Se consideró como exactitud valores menores o iguales a ± 2 para la DEO y de $\%R$ entre 95 y 105%.

Linealidad:

La evaluación de la linealidad se realizó mediante la determinación del analito 20 veces consecutivas en alícuotas de estándares de concentraciones (mg/dL): Baja: 0; 40; 50; media: 100, 200 y alta: 500, 1000 y 1200. Se determinó el CV con las medias y DE de las absorbancias obtenidas para cada estándar. Al resultar esta satisfactoria, se calculó la ecuación de la recta por el método de los mínimos cuadrados para ajustar los valores experimentales obtenidos, graficando estos resultados versus los valores de concentración correspondiente a cada estándar.

Sensibilidad:

Para la evaluación de la sensibilidad se realizaron 20 determinaciones consecutivas de triglicéridos en alícuotas de estándares de concentración bajas: 0; 40 y 50 mg/dL. Con los valores de absorbancia se calculó la media (VO), desviación estándar (DE) y con éstos, a su vez, el coeficiente de variación (CV). Luego se efectuó una prueba de diferencia de medias entre los estándares de 40 y 50 mg/dL por ser los de menor diferencia de

concentración entre sí. Considerándose positividad de la sensibilidad al existir una diferencia de medias estadísticamente significativa ($p= 0,05$) entre los estándares utilizados a tal fin y una pendiente mayor de 45° al realizar la gráfica correspondiente, además de un CV menor a 5% en los resultados de cada estándar procesado. Simultáneamente a los ensayos estándar, se procesaron ensayos control (C) empleando un suero control comercial valorado (Sigma Diagnostics, Lote: 021k8404). De igual manera, con los resultados de estos ensayos se calculó el CV, además de la Desviación Estándar Obtenida (DEO) a objeto de verificar la confiabilidad de la determinación, considerando la misma como positiva si el CV era menor o igual a 5% y una DEO menor o igual a ± 2 .

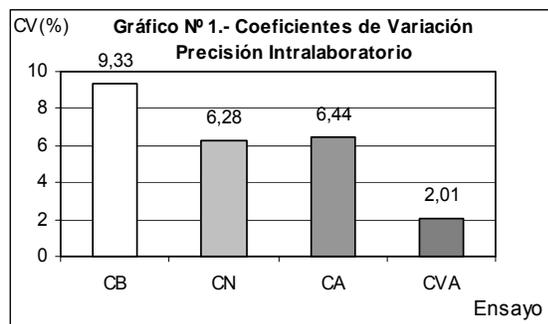
La calibración de todos los ensayos se realizó mediante 20 ensayos de blanco de reactivo y de 20 ensayos de patrones de triglicéridos de concentración 200 mg/dL, efectuándose las mediciones de absorbancias en un Shimadzu CL - 750 para los ensayos CB, CN, CA y en un Gilford Stasar IV para los ensayos CVA, RM, RA y M, ajustando a cero con agua destilada. Todas las pruebas se efectuaron en el Laboratorio de Bioquímica Clínica de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (Mérida-Venezuela).

RESULTADOS Y DISCUSION

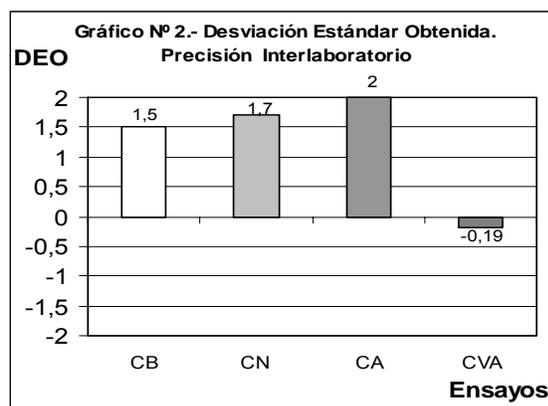
Los resultados obtenidos de la determinación de precisión intralaboratorio se presentan en la Gráfica N° 1, los mismos reflejan que hubo precisión interensayo en todos los niveles de controles (CB, CN, CA, CVA) ya que sus CV son menores al 10%. Siendo notorio que el CB fue el ensayo que presentó el mayor CV con un 9,33%, probablemente por la baja concentración de este control (Rodríguez y col., 2001b). Los CV encontrados para CB, CN y CA fueron superiores a los obtenidos por HUMAN (2000) al realizar 6 ensayos para cada control, utilizando un método enzimático colorimétrico con factor aclarante de lípidos reportando CV superiores al 5%, los cuales resultan superiores a los obtenidos en el CVA, lo cual indica la posibilidad de factores inherentes a los materiales de control en lugar del método. Situación similar se encuentra si se comparan los resultados con los de la casa comercial Wiener Lab. (1998) al procesar ensayos por duplicado diariamente utilizando controles de baja y alta concentración (Wiener Lab., 1998).

En cuanto a la precisión interlaboratorio (Gráfica N° 2), los resultados de las desviaciones estándar obtenidas (DEO) presentaron niveles inferiores al valor permitido para este parámetro, es decir menores o iguales a ± 2 , reflejando precisión interlaboratorio en

dichos ensayos, al igual que exactitud del método al presentarse una DEO de -0,19 en el CVA; no encontrándose estudios anteriores relacionados con la determinación de este parámetro para este analito.



CB: Control de concentración inferior al rango de referencia;
 CN: Control de concentración dentro del rango de referencia
 CA: Control de concentración superior al rango de referencia;
 CVA: Control con valor Asignado por el PEEC de la FBA



CB: Control de concentración inferior al rango de referencia;
 CN: Control de concentración dentro del rango de referencia
 CA: Control de concentración superior al rango de referencia;
 CVA: Control con valor Asignado por el PEEC de la FBA

En la Tabla 1 se reflejan los resultados obtenidos de los ensayos procesados para la evaluación de la exactitud con sus respectivos CV, los mismos indican precisión en la determinación. Además, los porcentajes de recuperación tanto para la RM como para la RA y M también indican exactitud por encontrarse entre el 95% y 105%. Estos hallazgos se correlacionan con los obtenidos por la Casa comercial Wiener Lab. (1998) en donde se procesaron ensayos adicionando diferentes concentraciones obteniéndose una recuperación entre el 97 y 101%.

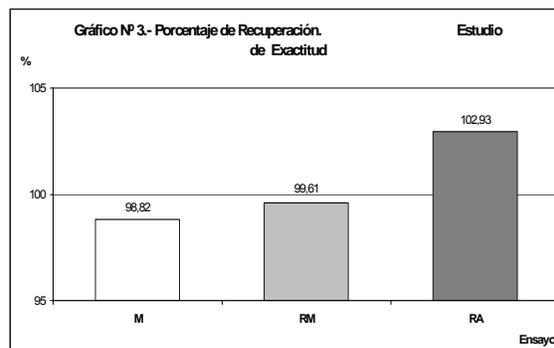
TABLA 1

Resultados de los ensayos en la determinación de la exactitud

Ensayo	M	RM	RA	CVA
VO(mg/dL)	96,68	214,37	324,43	134,27
DE(±)	7,29	12,88	11,92	2,71
CV(%)	7,54	6,00	3,67	2,01

VO= Valor obtenido=media; DE= Desviación Estándar; CV= Coeficiente de Variación;
 M= Mezcla; RM= Recuperación Media; RA=Recuperación Alta; CVA: Control con Valor Asignado

Por su parte, en la Tabla Nº 2 se presentan los resultados de confiabilidad en la determinación de la linealidad y sensibilidad, demostrando precisión para todos los estándares utilizados. Ello, junto al hecho de que el ensayo C aporta un CV de 0,19% y una DEO de 0,17 indica que hubo confiabilidad en la determinación efectuada.



M: Mezcla; RM: Recuperación Media; RA: Recuperación Alta

El test de diferencia de media (Tabla Nº 2) entre los estándares de 40 y 50 mg/dL reflejó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los mismos, indicando que el método posee una muy buena sensibilidad, al diferenciar mínimas concentraciones. Por ello, puede ser utilizado para determinaciones en pacientes con bajos niveles de triglicéridos.

TABLA 2

Confiabilidad en la determinación de los ensayos de linealidad y sensibilidad.

S= Estándares. Abs= Absorbancias. C= Control c= Valor en mg/dL
 VO= media=valor obtenido. DE= Desviación estándar CV= Coeficiente de variación
 DEO= Desviación Estándar Obtenida * =significativa ($p = 0,05$)

Al calcular la ecuación de la recta, correlacionando los valores de concentración versus las absorbancias obtenidas por el método de los mínimos cuadrados, ésta resultó en una línea recta hasta el nivel de 1000 mg/dL (Gráfica N° 4) por lo que se considera que el método es lineal para un rango de concentración comprendido entre 0,00 y 1000 mg/dL. Este nivel de linealidad es superior al mostrado por los métodos de las casas comerciales Human (2000) y Sigma Diagnostics (1992). Esto indica que el método de Laboratorios Heiga puede ser empleado en concentraciones elevadas del analito.

Por su parte, la recta resultante: $Y = 0,07 + 0,0019X$, presentó una pendiente mayor a 45°, lo cual corrobora la buena sensibilidad que presenta el método.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, el método evaluado presenta precisión intralaboratorio e interlaboratorio, así como exactitud para concentraciones bajas, normales y altas.

La sensibilidad es satisfactoria y presenta linealidad para concentraciones entre 0 y 1000 mg/dL.

Es recomendable la dilución de muestras de pacientes que presenten una concentración de triglicéridos superior a 1000 mg/dL, además de evaluar el paralelismo del método.

El reactivo Ref. 880-L Laboratorios HEIGA, C.A. puede ser empleado para la determinación manual de triglicéridos en los laboratorios clínicos a concentraciones bajas, medias y altas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Baffi, R. 1997. **The role of assay validation in specification development.** En: Brown, F, Fernandez, J. (eds): Development of specifications for Biotechnology Pharmaceutical products. Dev. Biol. Stand. Basel, Karger. 91: 105-113.

Boquet, E.; Castillo, M.; Cáceres, A.; Dybkaer, R.; Escutia, V.; Franzini, C.; Jeffers, D.; Mazziotta, D.; McClacthey, K.; McQueen, M.; Rej, R.; Ruiz, A.; Ruiz, G.; Sierra, R.; Terres, A.; Tiburcio, H. y Wilde, C. 1996. **Mejoría Continua de la Calidad. Guía para los Laboratorios Clínicos de América Latina.** Confederación Latinoamericana de Bioquímica Clínica. Editorial Médica Panamericana. México 314 p.

Carey, R. y Garber, C. 1990. **Evaluación de métodos.** En: Kaplan, L. y Pesce, A. **Química Clínica. Teoría análisis y correlación.** Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. p.p. 332-416.

Cortes M., Alsina, M. y Salas, A. 1994. **Selección y Evaluación de Métodos Analíticos.** González, F. **Bioquímica Clínica. Semiología y Diagnóstico:**

Interpretación de los datos de laboratorio. Barcelona: Editorial Barcanova. p.p. 33-48.

González, S. 1993. **Bioquímica Clínica: Bases y principios.** Mérida: Universidad de Los Andes. 68P.

HUMAN. 2000. In vitro diagnóstica. **Triglycerides Liquicolor Mono.** En: Manual de productos e métodos.

HUMAN GmbH. 2006. **Triglycerides Liquicolor Mono.** En: Productos 2000-2006. Química Clínica.

Immanuel, S. Gantini, A. Drama, R., Samino. 2006. **The role of lipid as a factor indicador for ischemic stroke at Mangunkusumo Hospital, Jakarta.** Acta Med Indones. 38(1):11-16.

INVELAB S.A. 2006. **TRIGLICERIDOS GPO-TRINDER. Colorimétrica.** En: Productos 2.006.

Kerrigan, S and Brooks, D. 1998. **Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative estimation of Lysergic acid diethylamide in urine.** Clin. Chem. 44(5): 985-990.

Kertesz, G, Bourcier, B., Cailla, H and Jean, F. 1998. **Inmunoradiometric assay of succinylated corticotropin: an improved method for quantification of ACTH.** Clin. Chem. 44(1): 78-85.

Laboratorios HEIGA C.A. 2000. **Triglicéridos enzimático líquido.** Reactivos para laboratorios clínicos. Caracas.

Naito, H. 1990. **Triglicéridos.** En Kaplan, L.; Pesce, A. Técnicas de laboratorio, fisiopatología - métodos de análisis. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. pp. 1223 - 235.

Repetto, J. 2005. **Reactivos y materiales.** En: Confederación Latinoamericana de Bioquímica Clínica. Gestión de la Calidad en el Laboratorio Clínico. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. pp. 347-369.

Richterich, R. y Colombo, J. 1983. **Química Clínica** (cuarta edición). Editorial Salvat. España.

Rodríguez, N., Torres, D., y Carvajal, M. 2001. **Confiabilidad del método de Jaffé modificado por Laboratorios Heiga para la determinación automatizada de la Creatinina.** Revista de la Facultad de Farmacia. 42:55 - 57.

Salve, M., Amich, S., Prieto, S. y Casas, A. 1994. **Laboratorio Clínico. Bioquímica.** Editorial Interamericana Mc Graw - Hill. Madrid.

Schreier, L., Berg, G., Brites, F., Lopez, G., Sanguinetti, S., Aisemberg, L., Gonzalez, A., Paglione, A. and Wikinski, R. 2001. **Diagnóstico bioquímico de las dislipidemias en el adulto.** Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. XXXV (2): 225 - 236.

Sigma Diagnostics. 1992. **Catalog triglycerides.** Canada. STANBIO Laboratory. 2006. **Catálogo de productos 2.006.** pp 9

WIENER LAB. 1998. **Manual de técnicas.** TG. Color GPO/PAP. Brasil

www.wiener-lab.com.ar/sp/vademecum.html. 2002. **TG. Color GPO/PAPAA.**