

# COMPARACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS EN EL LABORATORIO CLÍNICO

Alvarado Ramírez Daniel Alejandro (1), Camargo Segovia Ana Laura (2), Deveze Álvarez Martha Alicia (3), Alonso Castro Ángel Josabab (3), Alba Betancourt Clara (3)

1 [Licenciatura en Nutrición, Universidad de Guanajuato] | [da.alvaradoramirez@ugto.mx]

2 [Clínica Hospital ISSSTE, Guanajuato, Gto.] | [ana.camargo@issste.gob.mx]

3 [Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [c.albabetancourt@ugto.mx]

## Resumen

**Introducción:** La importancia de medir la cantidad de colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad (HDL-C) y de baja densidad (LDL-C), para la salud de los pacientes, hace de particular relevancia la medición de la disminución de HDL-C. Dependiendo del método analítico utilizado se pueden reportar resultados erróneos y establecer un panorama diferente al que presenta el paciente. **Materiales y Métodos:** Se procesaron 99 muestras de suero en sangre de pacientes ambulatorios del ISSSTE, Guanajuato, utilizando un equipo VITROS 4600 (automatizado) y CLIMA PLUS (semiautomatizado); los resultados fueron comparados mediante la prueba T Student. **Resultados y Discusión:** Se encontraron diferencias significativas en la medición de HDL ( $p < 0.0001$ ); estas diferencias pueden ser debidas al pretratamiento y centrifugación de la muestra que ocupa el analizador VITROS 4600, para precipitar las fracciones no-HDL. **Conclusión:** No se observaron diferencias significativas en la cuantificación de colesterol y triglicéridos con un método automatizado vs semiautomatizado. Las diferencias en la medición de HDL puede deberse al proceso de centrifugación, al  $MgCl_2$  o al error inherente al pipeteo. Debe tenerse cuidado en el manejo de las muestras y del equipo para reducir el porcentaje de error y asegurar la confiabilidad de los análisis.

## Abstract

**Introduction:** The importance of measuring the amount of cholesterol linked to high (HDL-C) and low density lipoproteins for the health of patients, makes the measurement of HDL-C decrease particularly relevant. Depending on the analytical method used, wrong results can be reported and a different perspective could be established than the one the patient presents. **Materials and methods:** 99 serum samples from ambulatory patients at the ISSSTE, Guanajuato, were analyzed with a VITROS 4600 analyzer (automated procedure) and CLIMA PLUS analyzer (semi-automated procedure), the results obtained were compared using the statistical method t student. **Results and discussion:** Significant differences were found in the HDL measurement ( $p < 0.0001$ ); these differences could be due to the VITROS 4600 analyzer required sample pretreatment and centrifugation, to precipitate the non-HDL fractions. **Conclusion:** There were no significant differences in cholesterol and triglycerides quantification with the automated and semi-automated methods. The HDL measurement differences could be due to the centrifugation process, the  $MgCl_2$  or the pipetting inherent error. Care should be taken when handling specimens and equipment to reduce the error percentage and to assure the analysis reliability.

## INTRODUCCIÓN

Las lipoproteínas (LP) se caracterizan por ser macromoléculas que permiten transportar los lípidos en el plasma puesto que estos son insolubles en agua y no pueden ser transportados en soluciones acuosas. Existen diferentes tipos de lipoproteínas, las cuales son: Quilomicrones, Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), Lipoproteínas de baja densidad (LDL), Lipoproteína a [Lp(a)], Lipoproteínas de alta densidad (HDL). [1]

Un nivel alto de colesterol total en plasma determina un riesgo cardiovascular que aumenta de forma exponencial cuando se asocia a otros factores de riesgo (obesidad, diabetes mellitus, fumar, entre otros). Se entiende por Dislipidemias a la alteración de la concentración normal de los lípidos en sangre. [2] Para llegar a realizar un diagnóstico de dislipidemias no es suficiente conocer la tasa de Colesterol Total, sino esclarecer el tipo de lipoproteína que lo está transportando.

En la actualidad es importante medir la cantidad de colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad (HDL-C) y de baja densidad (LDL-C); siendo de particular relevancia la medición de la disminución de HDL-C [3]. Dependiendo del método analítico utilizado se pueden reportar resultados poco confiables y establecer un panorama diferente al que presenta el paciente. Por ello surge la importancia en la comparación de métodos; para hacer más preciso el análisis y saber en realidad que tan confiable es un método con respecto a otro, a través de análisis estadístico.

Actualmente se habla de la garantía de la calidad, frente a la demanda creciente de los usuarios del laboratorio clínico (médicos y pacientes) y como resultado del avance científico y tecnológico, se requiere controlar la operación total, incluyendo las etapas pre-analítica, analítica y post-analítica. [3]

Son varios los aspectos que deben controlarse para conseguir resultados correctos. En esta búsqueda de la calidad desempeñan un papel determinante factores tales como: reactivos utilizados, calibración de instrumentos y equipos, técnicas utilizadas y, desde luego, la formación y destreza del personal que las ejecuta.

## Errores de origen técnico

Reactivos. La problemática puede deberse a la caducidad de los reactivos o a su alteración por almacenamiento en condiciones poco idóneas. Es necesario realizar un control de la reactividad de los mismos con una o más muestras conocidas. [4]

Muestras. La calidad de las muestras puede verse afectada por las técnicas de extracción y de conservación. En la conservación influyen dos parámetros: temperatura y el pH. Durante las primeras 6 horas a temperatura ambiente no se debe observar modificación alguna de los metabolitos y enzimas. A 4°C y en recipiente cerrado, el plasma y el suero pueden ser conservados hasta 24 horas sin que presenten modificaciones. Para preservar su conservación por más tiempo es necesario congelarlos o liofilizarlos. [5]

Equipo. Los instrumentos empleados pueden estar mal calibrados; entendiéndose por calibración a la relación entre el equipo (instrumento de medición o medida materializada) y el patrón, los cuales se relacionan a través del error, linealidad e incertidumbre. [6]

Métodos. Pueden surgir errores debido a prácticas inadecuadas en el desarrollo de las instrucciones del fabricante de los reactivos utilizados. Ha sido difícil encontrar métodos directos con una especificidad adecuada, ya que un gran número de factores relacionados con la genética, la nutrición, la enfermedad y el tratamiento afectan la composición de las lipoproteínas. [7]

## La automatización como medio para eliminar errores.

La automatización ha venido a impartir rapidez, estandarización y seguridad a las pruebas de laboratorio. Siguiendo las indicaciones del fabricante, los procesos automatizados evitan errores en los procedimientos y en la transcripción de datos, siempre que los resultados se transmitan directamente al ordenador central.

El analizador para química VITROS 4600 (Figura 1) es un analizador totalmente automatizado que ofrece un menú completo de química para pruebas de rutina y especiales. Cuenta con una nueva interface de usuario estandarizada, lo que

simplifica la operación y mejora la trazabilidad e integridad de la muestra. Facilita hacer diagnósticos más rápidos, esto contribuye a mejorar la atención médica hacia el paciente con resultados de calidad y eficiencia hasta del 95% asegurando la calidad del resultado. [8]

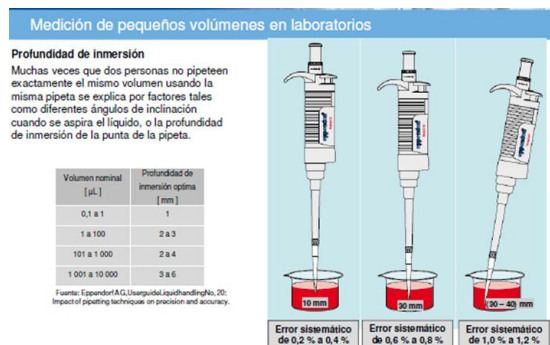


**Figura 1: Equipo VITROS 4600**

- El Método Semiautomatizado

El pipeteo debe ser preciso, para que las muestras de línea de base y las que contienen los reactivos reflejen el mismo grado de dilución y exactitud con el fin de añadir una cantidad conocida de sustancia interferente (reactivo). [9]

En la Figura 2 puede observarse un esquema que ejemplifica un caso concreto de variabilidad en las mediciones (pipeteo), como puede ser la inclinación de la pipeta para la obtención de un volumen en específico.



**Figura 2: Impacto de la técnica del pipeteo en la precisión y exactitud. Equipo Labnet. Fuente: Eppendorf AG, Userguide Liquid handling No. 20.**

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para el método automatizado se utilizó el analizador de química seca marca VITROS 4600

proporcionado por la Clínica Hospital ISSSTE de Guanajuato, Gto.

El método semiautomatizado se determinó de forma gravimétrica con micropipetas de 10, 20 y 1000 microlitros (µL) de la marca Labnet; los reactivos utilizados de la marca spinreact fueron los siguientes: Colesterol (1 ml), triglicéridos (1 ml), HDL (1 ml); y el LDL se calculó mediante la fórmula de Friedewald, la cual se presenta a continuación:

$$LDLc = CT - (HDLc + TG/5)$$

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se procesaron 99 muestras de población ambulatoria atendida en el Laboratorio de Análisis Clínicos de la Clínica Hospital del ISSSTE de Guanajuato, utilizando el analizador VITROS 4600 (método automatizado) y con reactivo de la marca spinreact en el equipo Clima Plus (método semiautomatizado).

Para el método semiautomatizado se realizó una calibración previa de las pipetas por medio de la técnica de pesaje y se calculó el coeficiente de variación, la Tabla 1 muestra los resultados obtenidos:

Volumen Pipeta	Coficiente de Variación 1	Coficiente de variación 2
10 µL	0.722	0.888
20 µL	0.471	0.426
1000 µL	0.009	0.009

**Tabla 1: registro de coeficientes de variación de pipetas de dos mediciones diferentes.**

Al obtener valores del coeficiente de variación menores a 1 podemos decir que la variabilidad en las mediciones (pipeteo) es mínima y por lo tanto confiable para poder realizar una medición manual de los parámetros a analizar.

El análisis estadístico de las muestras analizadas se realizó mediante la prueba T Student; con un intervalo de confianza del 95%, encontrando únicamente diferencias significativas en el colesterol HDL dando un valor de  $p < 0.0001$ ; los datos se muestran a continuación en la Tabla 2:

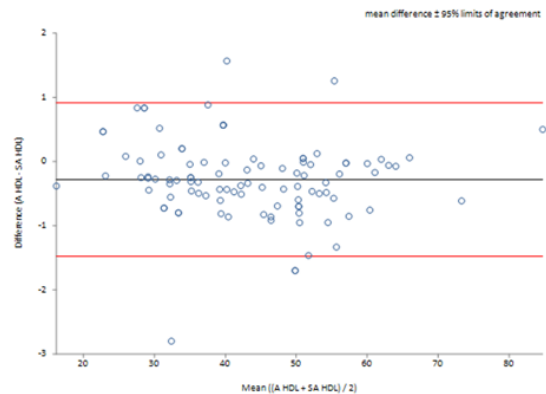
Automatizado vs Semiautomatizado	Valor de P1	Valor de P2
COLESTEROL	0.0697	0.1393
TRIGLICÉRIDOS	0.0554	0.1109
HDL	<0.0001	<0.0001
LDL	0.0805	0.161

**Tabla 2: Valores obtenidos de la prueba T de Student para la observación de diferencias entre las mediciones realizadas. P1 corresponde al valor de una cola y P2 al de dos colas. Se tomaron los valores de  $P \leq 0.05$  como significativos.**

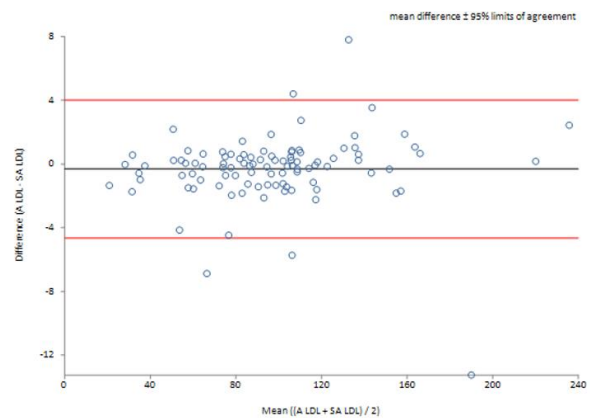
El comportamiento de las mediciones de los valores de HDL pueden observarse en la Figura 3, en donde se muestra la gráfica de dispersión de los datos con respecto a la media y a los intervalos del 95% de confianza. En el caso del comportamiento de las mediciones y los cálculos del LDL, las mediciones se encuentran muy cercanas a la media y dentro del intervalo de confianza (Figura 4).

Las diferencias significativas en el colesterol HDL son debidas al pretratamiento de la muestra que ocupa el analizador VITROS 4600, en el cual se mezcla sulfato de dextrano y cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ), los cuales precipitan las fracciones no-HDL, que son descartadas posterior a una centrifugación. En el método semiautomatizado, el reactivo utilizado contiene enzimas específicas, las cuales favorecen también la precipitación sin necesidad de un pretratamiento o centrifugación de la muestra. Aunado al posible error del pipeteo, es probable que el pretratamiento y centrifugación de la muestra sean factores decisivos para la variabilidad de las mediciones. En un estudio realizado en Japón donde se compararon diferentes métodos, se demostró que reactivos como el  $MgCl_2$ , el cual precipita las fracciones no-HDL-C, son dependientes de la concentración en que se utilizan, para asegurar que las mediciones de HDL-C sean confiables; por lo mismo, una concentración de  $MgCl_2$  de 24.4 mmol/L, (en el VITROS 4600 se utiliza 2mmol/L) no alteró la concentración de colesterol total y la precipitación de fracciones no-HDL-C tampoco se vieron alteradas por un valor aumentado de triglicéridos (TG). [10]

Sin embargo, la variación en el HDL no afectó en los cálculos del LDL, ya que no se observaron diferencias significativas entre los datos calculados y los medidos por el VITROS 4600.



**Figura 3: Comportamiento de las mediciones de las muestras de colesterol HDL. La línea negra corresponde a la media de los valores y las líneas rojas al intervalo del 95% de confianza.**



**Figura 4: Comportamiento de las mediciones de las muestras de colesterol LDL. La línea negra corresponde a la media de los valores y las líneas rojas al intervalo del 95% de confianza.**

## CONCLUSIONES

No se observaron diferencias significativas en la cuantificación de colesterol y triglicéridos al utilizar un método automatizado vs uno semiautomatizado. Las diferencias observadas en la medición de HDL puede deberse a la diferencia de métodos (precipitante vs no precipitante), a la ausencia de  $MgCl_2$  en el método semiautomatizado o al error inherente al pipeteo. Por otro lado, se debe tener cuidado en el manejo de las muestras y seguir las indicaciones de manejo del equipo para reducir la incidencia del porcentaje de error para así asegurar la confiabilidad de los análisis.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo técnico dentro del laboratorio de la M.C. Ma. de los Ángeles Rodríguez Salazar; dentro de la Clínica Hospital ISSSTE Guanajuato a la TPAC. Sonia del Carmen Lozano Rodríguez y la QFB. Graciela González Gómez por las atenciones brindadas y de su capacitación para la realización de este verano de investigación.

## REFERENCIAS

### Libro:

- [1] Osorio JH, Suárez YJ, Pérez JE. (2013). Comparación de dos métodos para la determinación de los niveles de HDL en caninos. *Biosalud*.12(2):60-65.
- [2] NORMA Oficial Mexicana NOM-037-SSA2-2012, Para la prevención, tratamiento y control de las Dislipidemias.
- [3] Franco, E. (2003). El control de la calidad en análisis inmunohematológicos en la Región de las Américas. *Rev. Panam. Salud Pública/Pan Am J Public Health*.13(2/3).
- [4] Manual de prácticas Bioquímica Clínica. (2009). Facultad de Química. UNAM. México.
- [5] Manual de conservación de muestras. (2011). Centro Médico de San Andrés Bogotá. Colombia.
- [6] ISO/IEC 17025. (2005). General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Second edition. International

Organization for Standardization. International Electrotechnical Commission.

[7] Roberts, E. G., Lee, E. L., Backman, D., Buczek-thomas, J. A., Emani, S., & Wong, J.Y. (2015). *HHS Public Access* 43(3), 762–773. <https://doi.org/10.1007/s10439-014-1210-6>. Engineering.

[8] Ortho-Clinical Diagnostics. Recuperado de: <http://www.labtronic.com.gt>. Fecha de consulta: 26/06/17.

[9] Alberini M. (2009). Medición de pequeños volúmenes en laboratorios. (1). 1-14. Recuperado de <http://www.inti.gob.ar/rafaela>. Fecha de consulta: 20/06/17.

[10] Okazaki, M., Sasamoto, K., Muramatsu, T., & Hosaki, S. (1997). Evaluation of precipitation and direct methods for HDL-cholesterol assay by HPLC. *Clinical Chemistry*, 43(10), 1885–1890.