

Método Slott modificado por Heiga para la valoración de creatinina: confiabilidad a 25 °C en el IMPACT 400E

NORYS RODRÍGUEZ, ZULAY LABRADOR, EYILDA GONZÁLEZ Y AIDA LORENTE.

Laboratorio de Bioquímica Clínica. Escuela de Bioanálisi. Facultad de Farmacia. Universidad de los Andes. Mérida .Venezuela. norys@hotmail.com

RESUMEN

Con el objetivo de verificar si el método Slott modificado por Laboratorios Heiga mantiene su confiabilidad a 25°C en instrumentos automatizados, se evaluó la exactitud, precisión, sensibilidad y linealidad del mismo, utilizando el reactivo Creatinina 510-A en el autoanalizador IMPACT 400E. La precisión y exactitud fueron determinadas con el CV y la DEO, respectivamente, resultante de la cuantificación de la creatinina en 30 alícuotas de sueros controles de concentración dentro (CN) y superior (CA) al rango de referencia. Se procedió de manera similar con estándares acuosos de concentración baja media y alta; aplicándose la t de Student ($p=0,05$) entre los estándares de concentración baja mas cercanas y una correlación lineal entre VE y VO, para la evaluación de la sensibilidad y la linealidad, respectivamente. Se encontró exactitud y precisión en el CN, solo precisión en el CA, sensibilidad y linealidad entre 0,25 mg/dL y 5 mg/dL. Se concluyó que el método estudiado mantiene su confiabilidad al ser utilizado en instrumentos automatizados a 25°C, ya que solo aumenta levemente su límite de detección.

ABSTRACT

To object of verifying the reliability of the Laboratorios Heiga modified Slott method to 25°C in automatic instruments, the accuracy, precision, sensitivity and linearity were determined using creatinine 510-A reagent and the IMPACT 400E autoanalyzer. The precision and accuracy were evaluated from 30 creatinine determination in control serums whose concentrations were equal (CN) and higher (CA) than reference ranges. The sensitivity and linearity were evaluated in a similar way, but using aqueous standards; these were verified applying the t Student test ($p=0,05$) between the low and close

concentration standards and linear correlation between VE y VO, respectively. We observed accuracy and precision in the CN, but only precision in the CA, sensitivity and linearity between 0,25 and 5,0 mg/dL. We concluded that the method keeps the reliability because It only showed a light increment on its detection limit.

PALABRAS CLAVE

Creatinina, confiabilidad, exactitud, precisión, sensibilidad, linealidad.

INTRODUCCIÓN

La concentración de la creatinina generalmente es determinada utilizando modificaciones de la reacción de Jaffé (Allston, 1.995), descrita en 1.886 y basada en la reacción de este compuesto, previa desproteínización de la muestra, con una solución alcalina de picrato de sodio a temperaturas inferiores a 30°C (Murray, 1.990), medida a 510-520 nm (Rodríguez y col., 2.001a). Una de dichas modificaciones es el método Slott, a su vez modificado por Laboratorios Heiga (casa comercial venezolana, fabricante de equipos de reactivos), el cual consiste en la determinación directa (sin desproteínización) manual con una incubación a 37°C durante 15 minutos (punto final), eliminando la influencia de los interferentes al corregir los resultados multiplicando por un factor de 0,6 por considerar que solo el 60% de los valores resultantes corresponde a la concentración real de creatinina (Laboratorios Heiga, C.A. Ref. 510-A).

No obstante, debido a la actual tendencia a la automatización, generada por la necesidad de realizar un gran volumen de pruebas en corto tiempo (Labrador, 2.000) y por la menor influencia de interferentes a temperaturas inferiores a 30°C (Roy, 1.990) se plantea la necesidad de evaluar la confiabilidad del método

Slott modificado por Laboratorios Heiga en instrumentos automatizados a 25°C.

La confiabilidad de un método analítico es su capacidad para proporcionar resultados óptimos (Confederación Latinoamericana de Bioquímica Clínica (COLABIOCLI). 1.996). Esta incluye la existencia de: exactitud, precisión, sensibilidad, especificidad (González, 1993; Kerrigan y Brooks, 1.998), linealidad (Baffi, 1.997; Carey y Garber, 1.990; González, 1.993) y paralelismo (González, 1.993; Kertesz y col., 1.998).

La exactitud (capacidad para obtener un resultado real (Baffi, 1.997; COLABIOCLI, 1.996; Skoog y col., 1.995)) puede ser evaluada mediante la comparación de los valores esperados (VE) de un suero control con los valores obtenidos (VO) mediante la Fórmula de Murali Dharán modificada en su aplicación por González y Lorente (1.989; 1.994). Mientras que la precisión (reproducción de los valores obtenidos (González, 1.993)) se evalúa mediante el coeficiente de variación ($CV = \text{desviación estándar relativa}$) de los valores obtenidos al determinar el analito en un suero control (Carey y Garber, 1.990; Day y Underwod, 1.989; Skoog y col. 1.995)

La sensibilidad de un método analítico es su capacidad para detectar pequeñas diferencias de concentración del componente que se ha de medir (Cortés y Col. 1.994); por lo que, es determinada mediante el procesamiento de estándares de baja y cercana concentración (Dharán, 1.983; Richterich y Colombo, 1.983. Por su parte, la linealidad puede ser definida como el intervalo de proporcionalidad entre la concentración del analito que el método valora y la unidad de medida (Carey y Garber, 1.990). Puede ser evaluada mediante el procesamiento de estándares acuosos de baja, media y alta concentración, correlacionando los valores esperados y obtenidos, lo cual debería resultar en una línea recta al realizar la representación gráfica (Rodríguez, 1.994).

Estos parámetros han sido probados para el método Slott modificado por Laboratorios Heiga, resultando preciso, exacto, sensible y lineal entre 0 y 5,0 mg/dL, por lo cual es posible que al adaptarlo a instrumentos automatizados a una temperatura de 25°C, mantenga o mejore su confiabilidad; siendo el objetivo del presente trabajo comprobar esta posibilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para evaluar la confiabilidad del referido método, se llevó a cabo la determinación de la precisión, exactitud, sensibilidad y linealidad, tal como se describe a continuación:

Determinación de Precisión y Exactitud: La precisión y exactitud fueron evaluadas con 30 cuantificaciones consecutivas de la creatinina en alícuotas de sueros controles comerciales valorados con concentración dentro (CN) ($0,99 \pm 0,10$ mg/dL) y superior (CA) ($5,90 \pm 0,59$ mg/dL) al rango de referencia del método en hombres ($<1,6$ mg/dL) y mujeres ($<1,5$ mg/dL). Con los resultados se calculó la media (VO), desviación estándar (DE), coeficiente de variación ($CV = (DE/VO) \times 100$) y Desviación estándar Obtenida ($DEO = (VE - VO)/DEE$), donde DEE (desviación estándar esperada) y correspondió al 10% del VE. Se consideró exactitud cuando el valor de DEO se encontraba entre -2 y $+2$ y precisión cuando el valor de CV era menor o igual a 10%.

Determinación de Sensibilidad: La sensibilidad se evaluó con 30 determinaciones consecutivas del analito en blancos de reactivos (0 mg/dL) y en alícuotas de estándares acuosos de concentración (mg/dL) muy baja (0,125 y 0,25); calculando la DEO y el CV para cada uno; además se aplicó un test de diferencia de medias (t de Student, $p=0,05$) entre ellos (0 y 0,125; 0,125 y 0,25); considerándose sensible el método si la misma era estadísticamente significativa y los resultados presentaban precisión y exactitud.

Determinación de Linealidad: La linealidad fue evaluada mediante 30 determinaciones consecutivas de creatinina en alícuotas de estándares acuosos de concentración (mg/dL) baja (0,25 y 0,50), media (0,75; 1,00; 1,25; 1,50), alta (1,75 y 2,00) y muy alta (5,00; 5,25 y 5,50). Con los valores obtenidos se calculó el CV y la DEO, además de la ecuación de la recta por el método de los mínimos cuadrados para ajustar los valores experimentales, graficando estos resultados versus los valores de concentración esperados para cada estándar. Se consideró como rango de linealidad aquellos valores de concentración entre los cuales los estándares presentaron exactitud y precisión, manteniendo proporcionalidad directa entre el VE y VO al hacer la representación gráfica.

Las determinaciones del analito se realizaron en el autoanalizador IMPACT 400E a 25°C, utilizando el reactivo Creatinina 510-A y calibrando con estándares acuosos de 1,0 y 4,0 mg/dL. El tiempo de incubación se mantuvo en 15 minutos, tal como indica el fabricante (Laboratorios Heiga, C. A., Ref. 510-A).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados que se presentan en la Tabla N° 1 muestran precisión (CV = 10%) en los dos niveles de sueros controles utilizados (CN y CA), existiendo el menor CV para el CN. Dichos CV son superiores a los encontrados por Rodríguez y col. (2.001b) al utilizar este método en forma manual. En cuanto al estudio de la exactitud, los resultados fueron similares al mismo; al presentarse solo en el CN con un ligero incremento sobre el rango establecido (entre - 2 y + 2) en el CA.

Tabla 1. Resultados de la determinación de precisión y exactitud.

SUERO CONTROL (VE+DEE) mg/dL	CN	CA
\bar{X} (VO)	1,389 0,83*	7,7663 4,66*
DE (+)	0,0793	0,4749
CV (%)	5,71	6,11
DEO	1,62	2,10

\bar{X} (VO = valor obtenido) = media aritmética de los 30 valores
 DE= Desviación estándar CV= Coeficiente de variación
 DEO= desviación estándar obtenida VE= Valor esperado
 DEE= desviación estándar esperada *= valor corregido con factor de 0,6
 CN= suero control comercial con concentración dentro del rango de referencia
 CA= suero control comercial con concentración superior al rango de referencia

Estos resultados difieren con los reportados por Rodríguez (1.994) en un estudio realizado con un método automatizado de tipo cinético, el cual arrojó precisión y exactitud solo en niveles muy altos de concentración. También difieren con los hallazgos de Rodríguez y col. (2.001a) al utilizar el método de Jaffé a modo cinético automatizado (de Laboratorios Heiga), en el cual se reportó precisión y exactitud en niveles bajo, dentro y sobre el rango de referencia.

Tabla 2. Resultados de la determinación de sensibilidad.

ESTÁNDARES (VE+DEE) mg/dL	0,00	0,125+0,013	0,25+0,25
\bar{X} (VO)	0,031	0,162	0,235
DE (+)	0,0316	0,0176	0,0394
CV (%)	101,94	10,86	1,66
DEO (+)	0,031/0	2,85	0,60
Diferencia \bar{X} *	Significativa		-
	-	Significativa	

\bar{X} (VO=valor obtenido)= media aritmética de los 30 valores DE= Desviación estándar
 CV= Coeficiente de variación DEO= desviación estándar obtenida
 VE= Valor esperado DEE= desviación estándar esperada *p =0,05
 CN= suero control comercial con concentración dentro del rango de referencia
 CA= suero control comercial con concentración superior al rango de referencia

Los resultados del estudio de sensibilidad (Tabla N° 2) demuestran precisión y exactitud solo para el estándar de 0,25 mg/dL; difiriendo levemente con los resultados encontrados al realizar la determinación con el mismo reactivo en modo manual (Rodríguez y col., 2.001b), donde resultó precisión a partir del blanco (0 mg/dL). A su vez, se presentan diferencias con los resultados encontrados por Rodríguez en 1.994 y Rodríguez y Rodríguez en 1.995 al utilizar métodos cinéticos automatizados (solo presentaban sensibilidad a partir del estándar de 0,75 mg/dL); sin embargo, hay similitud con el método cinético automatizado de Laboratorios Heiga (Reactivo 520), el cual reportó sensibilidad a partir del estándar de 0,20 mg/dL.

Es resaltante que en ninguno de los métodos automatizados para la determinación de creatinina se haya presentado precisión y exactitud en el estándar de 0 mg/dL, aparentando reportar niveles de creatinina. Sin embargo, este hecho es atribuible a fluctuaciones en el autoanализador utilizado, ya que al emplear el mismo reactivo en forma manual se obtuvo buenos resultados en este ensayo.

Por su parte, el test de diferencia de medias (Tabla N° 2) entre los estándares: 0,00-0,125 y 0,125-0,25 mg/dL determinó diferencias significativas (p= 0,05) entre ellos. Esto parece indicar que el método posee buena sensibilidad, al poder diferenciar mínimas concentraciones; no obstante, su límite de detección confiable es de 0,25 mg/dL, ya que es a partir de esta concentración donde se presenta precisión y exactitud en los estándares.

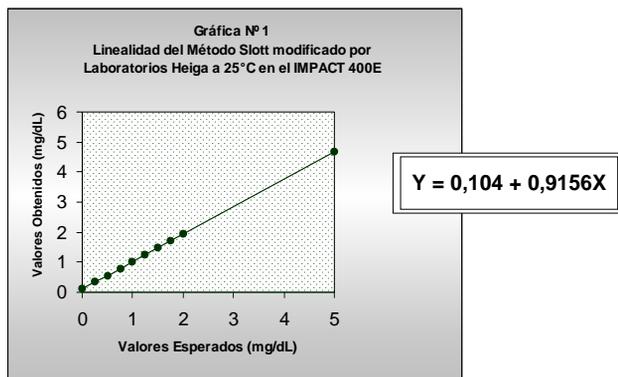
Los resultados del estudio de linealidad se presentan en la Tabla N° 3, allí puede apreciarse precisión y exactitud en los estándares a partir de 0,25 mg/dL. Al calcular la ecuación de la recta, correlacionando los valores de concentración esperados versus los obtenidos, ésta resultó en una línea recta hasta el nivel de 5,0 mg/dL (Gráfica N° 1). Por todo esto, se considera que el rango de concentración para la linealidad está comprendido entre 0,25 y 5,00 mg/dL, diferenciándose levemente con la utilización manual donde la linealidad es positiva a partir de 0 mg/dL (Rodríguez y col., 2.001b).

Por otra parte, estos resultados también se diferencian de los ya referidos métodos utilizados por Rodríguez en 1.994, Rodríguez y Rodríguez (1.995) donde la linealidad solo se presentaba en niveles de concentración dentro y superior al rango de referencia del analito, y con el método cinético estudiado por Rodríguez y col. (2.001a), cuyo rango superior de linealidad fue mayor a 10 mg/dL.

Tabla 3. Resultados de la determinación de linealidad

ESTÁNDARES (VE+DEE) mg/dL	0,00	0,25 +	0,50 +	0,75 +	1,00 +	1,25 +	1,50 +	1,75 +	2,00 +	5,00 +	5,25 +	5,50 +
		0,25	0,05	0,075	0,10	0,125	0,15	0,175	0,20	0,50	0,525	0,55
\bar{X} (VO)	0,031	0,235	0,598	0,851	0,971	1,258	1,525	1,759	2,00	4,740	4,855	5,086
DE (+)	0,0316	0,0394	0,028	0,038	0,038	0,058	0,067	0,072	0,101	0,246	0,056	0,065
CV (%)	101,94	1,66	4,74	4,46	3,86	4,59	4,37	4,07	5,09	5,19	1,15	1,28
DEO (+)	0,031/0	0,60	1,95	1,35	0,29	0,07	0,16	0,05	0,02	0,52	0,74	0,75

\bar{X} (VO=valor obtenido)= media aritmética de los 30 valores DE= Desviación estándar CV= Coeficiente de variación
 DEO= desviación estándar obtenida VE= Valor esperado DEE= desviación estándar esperada
 CN= suero control comercial con concentración dentro del rango de referencia
 CA= suero control comercial con concentración superior al rango de referencia



CONCLUSIONES

El método Slott modificado por Laboratorios Heiga, presenta exactitud, precisión, sensibilidad y linealidad para soluciones acuosas y albuminadas de concentración baja, normal y alta (inferior a 5,0 mg/dL).

La falta de exactitud en el CA es atribuible a la pérdida de la linealidad en concentraciones superiores a 5,00 mg/dL.

Al ser adaptado al IMPACT 400E a 25°C, este método solo aumenta levemente su límite de detección y rango inferior de linealidad.

Por lo tanto, puede considerarse que el método estudiado, aunque no mejora, si mantiene su confiabilidad al ser utilizado en estas condiciones, pudiendo ser empleado indistintamente de forma manual o en instrumentos automatizados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allston, C.A. 1.995. **Compuestos nitrogenados no proteicos y funcionamiento renal.** En: Anderson, S. y Cockayne, S. Química. Editorial McGraw-Hill. México. P. 369 – 387.

Baffi, R. 1.997. **The role of assay validation in specification development.** En: Brown, F, Fernandez, J. (eds): Development of specifications for Biotechnology Pharmaceutical products. Dev. Biol. Stand., 91: 105-113.

Carey, R. y Garber, C. 1.990. **Evaluación de métodos.** En: Kaplan, L. y Pesce, A. Química Clínica. Teoría análisis y correlación. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. P. 332-416.

CONFEDERACIÓN LATINOAMERICANA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA. 1.996. **Mejoría continua de la calidad. Guía para los laboratorios clínicos de América Latina.** Editorial Médica Panamericana, México.

Cortes M., Alsina, M. y Salas, A. 1.994. **Selección y evaluación de métodos analíticos.** En: González, F. Bioquímica Clínica. Semiología y diagnóstico: Interpretación de los datos de laboratorio. Editorial Barcanova. Barcelona. P. 33-48.

Day, R. y Underwood, A. 1.989. **Química Analítica Cuantitativa.** Editorial Prentice-Hall Hispanoamericana, S.A. México. P. 45-49.

Dharán, M. 1.983. **Control de calidad en los laboratorios clínicos.** Editorial Reverté, S.A. Barcelona.

González, S. 1.993. **Bioquímica Clínica: Bases y principios.** Mérida: Universidad de Los Andes. Facultad de Farmacia. Escuela de Bioanálisis. Mérida-Venezuela.

González, S. y Lorente, A. 1.989. **Sistema Básico de Control de calidad.** Universidad de los Andes. Facultad de Farmacia. Escuela de Bioanálisis. Mérida-Venezuela.

González, S. y Lorente, A. 1.994. **Sistema Básico de Control de Calidad.** Universidad de Los Andes. Facultad de Farmacia. Escuela de Bioanálisis. Mérida-Venezuela.

Kerrigan, S and Brooks, D. 1.998. **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. 1.998.. **Inmunorradiometric assay of succinylated corticotropin: an improved method for quantification of ACTH.** Clin. Chem. 44(1): 78-85.

Labrador, C. 2.000. **Automatización en el laboratorio clínico.** Universidad de Los Andes. Facultad de Farmacia. Escuela de Bioanálisis. Mérida-Venezuela.

Murray, R. L. 1.990. **Enfermedad renal.** En: Pesce, A. Kaplan, L. Química Clínica. Métodos. Editorial Médica panamericana. Buenos Aires. P. 35, 1474 - 1.478.

Richterich, R. y Colombo, J. 1.983. **Fidelidad de los métodos de laboratorio.** En: Química Clínica. Teoría, práctica e interpretación. Salvat Editores, S.A. Barcelona. P. 58-68.

Rodríguez, N. 1.994. **Aplicación del Sistema Básico de Control de Calidad en el Laboratorio de Bioquímica Clínica del C.A.M.O.U.L.A.** Universidad de Los Andes. Facultad de Farmacia. Escuela de Bioanálisis. Mérida-Venezuela.

Rodríguez, N., Torres, D. y Carvajal, M. 2.001a. **Confiabilidad del método de Jaffé modificado por Laboratorios Heiga para la determinación automatizada de creatinina.** Revista de la Facultad de Farmacia. 42: 55-62.

Rodríguez, N.; Lorente, A.; Velásquez, Y. y González, E. 2001b **Confiabilidad del método Slott modificado por Laboratorios Heiga para la determinación directa de la creatinina.** Revista de la Facultad de Farmacia. 42: 67-71.

Rodríguez, N. y Rodríguez, E. 1.995. **Linealidad y sensibilidad del método de Jaffé modificado a 37 grados centígrados empleando reactivos Sigma y Ciba – Corning.** Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 24 (3): 361.

Roy, F. 1.990. **Enfermedad Renal.** En: Pesce, A. y Kaplan, L. Química Clínica. Métodos. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. P. 469-487.

Skoog, D., West, D. y Holler, F. 1.995. **Química Analítica.** Editorial McGRAW-HILL. México. P. 3, 52-56, 69-69, 92-94.