

ESTUDIO COMPARATIVO DE EXACTITUD EN LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA SÉRICA POR CUATRO MÉTODOS

Marianela Vargas U., Karl Schosinsky N., Eduardo Brilla S.,
Eduardo Vinocour G. y José Miguel Esquivel Ch*

Key Word Index: Glicemia, methods

RESUMEN

Se analizó comparativamente la exactitud, en la determinación de glucosa sérica mediante pruebas de recuperación e interferencia para el método de la o-toluidina, un método automatizado que utiliza ferricianuro y dos métodos enzimáticos, el de la glucosa oxidasa y el de la hexoquinasa. La ley de Beer y Lambert para los métodos de la o-toluidina, ferricianuro, glucosa oxidasa y hexoquinasa se cumplió hasta 600, 300, 600 y 500 mg/dl respectivamente. Se obtuvo una recuperación adecuada para esos métodos, en el mismo orden, hasta 300, 300, 500 (no se evaluó en este caso 600 mg/dl que es el límite máximo de linealidad) y 500 mg/dl. El método de la o-toluidina hubo interferencia marcada por galactosa, manosa y ácido úrico y moderada por fructosa, salicilatos y bilirrubina. En el método del ferricianuro la interferencia fue marcada con fructosa, galactosa, y ácido ascórbico y moderada con creatinina, manosa y salicilatos. En cuanto al de glucosa oxidasa hubo interferencia marcada únicamente por ácido ascórbico y moderada por bilirrubina. Con hexoquinasa hubo interferencia moderada únicamente por fructosa. Por su exactitud, ambos métodos enzimáticos son satisfactorios como sustitutos de los métodos tradicionales; sin embargo, el método de la glucosa oxidasa se considera más adecuado por cuanto puede efectuarse con cualquier fotómetro o espectro fotómetro y el reactivo es más estable y de menor precio. [Rev. Cost. Cienc. Méd. 1986; 7(2): 173-179]

INTRODUCCIÓN

En Costa Rica el método más ampliamente usado para la determinación de glucosa es el de la o-toluidina. Desde el punto de vista práctico, presenta el inconveniente de que el reactivo se prepara con ácido acético concentrado y resulta muy irritante para los analistas; además,

al ser corrosivo ocasiona un deterioro paulatino de los espectrofotómetros y fotómetros, empleados para las lecturas del producto final coloreado.

Por otra parte, el método de la o-toluidina ha sido superado en cuanto a exactitud por los métodos enzimáticos, que usan glucosa oxidasa y hexoquinasa, ya que se ha reportado que los azúcares reductores, varios medicamentos, el ácido úrico, la creatinina y la bilirrubina interfieren en el método de la o-toluidina (4), mientras que en los métodos enzimáticos de la glucosa oxidasa y la hexoquinasa, el número de interferentes es mínimo y el grado de interferencia variable (2).

Debido a las inconveniencias citadas, es necesario sustituir el método de la o-toluidina por uno con reactivos no cáusticos y de mejor exactitud, que además sea lo suficientemente sencillo y de bajo costo como para ser usado rutinariamente.

Al igual que en el método de la o-toluidina, el método automatizado basado en la reducción del ferricianuro es afectado por varias sustancias interferentes, fundamentalmente la creatinina y el ácido úrico, observándose valores de glucosa falsamente elevados en pacientes urémicos (2).

El presente estudio se realizó con el objetivo de evaluar algunas ventajas y desventajas de los métodos de la o-toluidina y el ferricianuro, al compararlos con métodos enzimáticos comerciales que usan glucosa oxidasa y hexoquinasa. La evaluación consistió en un análisis previo de cada método donde se determinó el efecto del tiempo sobre la formación del producto final coloreado y los intervalos de linealidad. Una vez corroborados estos parámetros, se procedió a evaluar el error proporcional mediante pruebas de recuperación y el error constante mediante pruebas de interferencia (7). Se determinó el efecto interferente de 15 sustancias en cada uno de los cuatro métodos. Este estudio preliminar es básico como criterio para la elección de una

* Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica

metodología sencilla, económica y exacta para la determinación de glucosa en condiciones de rutina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Equipo

Las lecturas espectrofotométricas para los métodos de la glucosa oxidasa, hexoquinasa y o-toluidina se realizaron en un espectrofotómetro Beckman modelo 34 (Beckman Instruments, Fullerton, CA 92634) y para el método del ferricianuro se empleó un autoanalizador (Autoanalyzer, Basic II, Technicon Corporation Instruments Corp., Tarrytown, N.Y. 10591). La cristalería utilizada fue lavada con una solución de ácido nítrico al 25 por ciento (v/v) y escrupulosamente enjuagada con agua destilada.

Muestras de suero

Se recogieron muestras de suero sin ictericia, lipemia o hemólisis visibles de pacientes hospitalizados. Se mezclaron para obtener volúmenes de aproximadamente 100 ml de suero y se conservaron a 4°C por un lapso no mayor de 24 h (Nota: según S.I.) hasta su análisis. Se agregó cantidades establecidas de glucosa u otras sustancias conocidas a alícuotas de suero, para obtener la concentración deseada en cada análisis.

Soluciones patrón

Se preparó una solución patrón concentrada de 1000 mg/dl de glucosa empleando glucosa anhidra grado reactivo previamente desecada en sílica, conteniendo 0,2 g/dl de ácido benzoico como preservante. Se efectuó las diluciones correspondientes para obtener soluciones patrón de 25, 50, 100, 200, 300, 500, 600 y 700 mg/dl a partir de la solución patrón concentrada. La solución de 100 mg/dl se empleó como solución patrón de trabajo.

Método de la glucosa oxidasa

Se empleó el método de Trinder (6) utilizando reactivos de Wiener Laboratories S.A.I.C. [Suipacha 2140 (2000) Rosario, Argentina] y la metodología por ellos indicada, pero variando los volúmenes de la muestra o solución patrón a 10 μ l y del reactivo de trabajo a 1,5 ml.

Método de la hexoquinasa

Se emplearon reactivos de Beckman Instruments y la metodología establecida por la casa comercial pero aumentando el período de incubación a 10 min.

Método de la o-toluidina

Se procedió según metodología descrita previamente (5) pero utilizando 50 μ l de muestra.

Método de ferricianuro

La preparación de reactivos y la metodología se efectuaron según lo establecido por Technicon Corporation para el autoanalizador Basic II.

Análisis de sustancias interfertentes

Se evaluó el efecto de 15 sustancias potencialmente interfertentes en cada uno de 4 métodos. Para ello se compararon los resultados obtenidos al analizar el suero sin la sustancia y el mismo suero con diferentes concentraciones de la misma. Las concentraciones deseadas se obtuvieron agregando un peso seco de la sustancia directamente al suero o el volumen necesario de una solución patrón concentrada. Las sustancias y concentraciones séricas respectivas fueron: fructosa, 10, 20, 40, 50, y 100 mg/dl; galactosa, 10, 20, 40 y 100 mg/dl; manosa 10, 20, 40, 50 y 100 mg/dl; creatinina, 2,5,8 y 10 mg/dl (se utilizó solución patrón concentrada de 100 mg/dl en HCl 0,1 mol/l); ácido úrico, 5, 10, 15 y 20 mg/dl (se utilizó solución patrón concentrada de 100 mg/dl con 75 mg/dl de carbonato de litio, 37 por ciento de formalina y 5 mmol/l de H₂SO₄); salicilato de sodio, 20, 40, 50 mg/dl; bilirrubina, 5, 10, 15 y 20 mg/dl, (se preparó de acuerdo con indicaciones en referencia 5); hemoglobina, 50, 100, 200 y 300 mg/dl (se utilizó un hemolizado con 3000 mg/dl); ácido ascórbico, 2, 5, 8 y 10 mg/dl; triglicéridos, 300, 500, 700 y 1000 mg/dl (se utilizó un suero conteniendo 1000 mg/dl de triglicéridos como quilomicrones fundamentalmente); fluoruro de sodio, 1 g/l; EDTA disódico, 150 mg/dl; heparina, 15 mg/dl; oxalato de sodio, 0,01 mol/l y citrato de sodio, 0,38 g/dl.

RESULTADOS

Efecto de los tiempos de incubación y de reposo sobre el desarrollo del producto final En el método de la hexoquinasa, al incubar la mezcla de reacción a 37°C en la cubeta termoregurable del espectrofotómetro, se presentó una reacción que se estabiliza en 1 minuto 30 segundos y no varía al menos por 26 minutos. Al incubar a 37°C en baño maría, la reacción requirió de más tiempo para estabilizarse. En experimentos múltiples, los tiempos de estabilización fueron variables; sin embargo, se determinó que 10 minutos de incubación a 37°C en baño maría son suficientes para que la reacción

se estabilice y los resultados obtenidos sean semejantes a los del sistema anterior.

En el método de la glucosa oxidasa la reacción a 37°C no se estabiliza en 30 minutos, independientemente de la incubación en baño maría o dentro del espectrofotómetro en cubeta termoregulada. Por lo tanto, se mantuvo una incubación por 10 minutos a 37°C, tal como se indica en el procedimiento comercial. El enfriamiento a temperatura ambiente después de la incubación disminuye la velocidad del desarrollo de color, pero no estabiliza la reacción. En la Fig. 1 se observa el desarrollo del producto final coloreado incubando 10 minutos a 37°C y la estabilidad del mismo a temperatura ambiente.

En el método de la o-toluidina, se obtuvo la máxima sensibilidad con un tiempo de ebullición de 8 minutos, tanto con sueros como con solución patrón. Sin embargo, tratando las soluciones patrón y las muestras en forma semejante pueden emplearse tiempos de ebullición entre 5 y 16 minutos sin que se modifique significativamente el resultado final. Transcurrido el tiempo de ebullición la mezcla de reacción se equilibró a temperatura ambiente enfriando en agua de tubo por 3 minutos. La intensidad del producto final coloreado en muestras de suero disminuye lentamente al transcurrir el tiempo de reposo, no así a solución patrón que se mantiene estable. Al mantener las mezclas de reacción del suero y la solución patrón en reposo por períodos iguales, la concentración de glucosa reportada en la muestra disminuye aproximadamente un tres por ciento después de 30 minutos de reposo, independientemente del período de ebullición.

En el método del ferricianuro no se evaluó efecto de los tiempos de incubación y de reposo sobre el desarrollo del producto final, por ser un método automatizado, con estos parámetros establecidos por la casa comercial.

Linealidad

El método de la o-toluidina y el de la glucosa oxidasa cumplen la Ley de Beer y Lambert hasta 600 mg/dl, el de la hexoquinasa hasta 500 mg/dl y el de ferricianuro hasta 300 mg/dl, cuando se emplean patrones acuosos de glucosa.

Pruebas de recuperación

Los resultados de las pruebas de recuperación de glucosa agregada a suero por los 4 métodos se muestran en el Cuadro 1.

Pruebas de interferencia

Al evaluar el efecto interferente de 5 anticoagu-

lantes: fluoruro de sodio, EDTA disódico, heparina, oxalato de sodio y citrato de sodio a las concentraciones usuales, no se produjo interferencia importante por ninguno de los métodos, a excepción de una interferencia leve de EDTA disódico en el método de la o-toluidina (Cuadro 2).

El efecto interferente de otras sustancias analizadas: fructosa, galactosa, manosa, bilirrubina, hemoglobina, triglicéridos, creatinina, ácido úrico, ácido ascórbico y salicilatos se resume en el Cuadro 3. La interferencia expresada en porcentaje es el promedio de los porcentajes de interferencia observados al agregar diferentes cantidades de cada sustancia al mismo suero.

DISCUSIÓN

La exactitud de un método analítico está determinada por los errores sistemáticos, que pueden ser proporcionales o constantes. La presencia de error proporcional puede detectarse mediante pruebas de recuperación, o mediante la pendiente en un estudio de regresión lineal al comparar el método en estudio con un método de referencia (7). En el presente trabajo, el error proporcional se evaluó mediante pruebas de recuperación, las cuales fueron satisfactorias para los métodos del ferricianuro, glucosa oxidasa y hexoquinasa.

En el método de la o-toluidina, no se obtuvo una buena recuperación con concentraciones superiores a 300 mg/dl de glucosa. Al agregar 200 mg/dl de glucosa a un suero conteniendo 107 mg/dl la recuperación fue del 96 por ciento y continuó disminuyendo al agregar más glucosa; los experimentos repetidos mostraron el mismo defecto. Esto implica que aunque el método es lineal hasta 600 mg/dl de glucosa usando soluciones patrón acuosas, su linealidad en suero puede considerarse hasta unos 300 mg/dl. Una evaluación previa del método de la o-toluidina en nuestro laboratorio (1) no demostró la presencia de error proporcional en el método, debido a que las pruebas de recuperación de glucosa sérica se efectuaron agregando un máximo de 100 mg/dl de glucosa al suero, concentración a la cual todavía no se observa recuperación disminuída.

En una evaluación y comparación de 10 métodos para determinación de glucosa (4), un método automatizado basado en la reacción de la o-toluidina, no presentó linealidad al analizar varias diluciones de un suero conteniendo una concentración de glucosa de 600 mg/dl, lo cual refleja la presencia de un error proporcional. Además en el estudio

comparativo de 185 muestras frente a un método de referencia por hexoquinasa, los mismos investigadores obtuvieron una pendiente de 0,9390, que corresponde a un error proporcional de -6,1 por ciento.

La presencia de errores constantes puede detectarse mediante el análisis de sustancias interferentes o mediante la intercepción en un estudio de regresión lineal (7). En la evaluación de sustancias interferentes, catalogando como interferencia marcada aquella mayor al 50 por ciento y moderada menor o igual al 50 por ciento, obtenemos que en el método de la o-toluidina hubo interferencia marcada por galactosa, manosa y ácido úrico y moderada por fructosa, bilirrubina y salicilatos. En el método del ferricianuro la interferencia fue marcada con fructosa, galactosa y ácido ascórbico y moderada por manosa, creatinina y salicilatos. En el método de la glucosa oxidasa hay una interferencia marcada por ácido ascórbico y moderada por bilirrubina y en el de la hexoquinasa hubo interferencia moderada por fructosa solamente. Los métodos enzimáticos que usan hexoquinasa, debido a su excelente especificidad y exactitud, frecuentemente son usados como referencia; sin embargo, los métodos directos muestran interferencia por fructosa, a diferencia de los que requieren de un filtrado libre de proteínas (3, 4). Ello se debe a que la hexoquinasa también actúa, aunque con menor afinidad, sobre la fructosa, produciendo fructosa-fosfato. Esta se transforma a glucosa-fosfato por la enzima fosfoglucoisomerasa, que se encuentra naturalmente en el suero humano y además podría ser un contaminante de los preparados enzimáticos contenidos en el reactivo (3). En general, los resultados sobre sustancias interferentes son congruentes con los obtenidos por Passey y colaboradores (4) con algunas excepciones: en los métodos con o-toluidina, observaron interferencias por ácido úrico de -13 y + 20 por ciento y por ácido ascórbico de -4 y -8 por ciento; en el método del ferricianuro observaron una interferencia producida por creatinina dos veces mayor a la nuestra y una interferencia por ácido úrico del 20 por ciento, y en el método de la glucosa oxidasa, nosotros obtuvimos el doble de interferencia por ácido ascórbico. Con respecto a los anticoagulantes más frecuentemente usados, ninguno de ellos produce una interferencia clínicamente significativa; nuestros resultados son congruentes con los de Passey y colaboradores (4).

En cuanto a los problemas prácticos observados durante la ejecución de los procedimientos cabe destacar que en el método de la o-toluidina

puede variarse el tiempo de incubación sin que se altere el resultado final, siempre y cuando la muestra y el patrón se traten en forma semejante; sin embargo, el tiempo de reposo no debería sobrepasar 15 minutos, ya que al transcurrir el tiempo el valor reportado de glucosa es menor. En el método de la glucosa oxidasa deben efectuarse las lecturas de absorbancia al tiempo exacto, ya que el desarrollo de color no se estabiliza. En el método de la hexoquinasa, las diferencias observadas en el desarrollo de color al incubar en baño maría y en cubeta termoregulada dentro del espectrofotómetro las atribuimos a la presencia o ausencia de luz. La reacción se estabiliza rápidamente dentro del espectrofotómetro en ausencia de luz y lo hace más lentamente incubando en baño maría; si se disminuye la entrada de luz al baño la velocidad de la reacción se acelera. Además, según las instrucciones del fabricante, este método requiere de blanco de muestra solamente en muestras ictericas, hemolizadas o lipémicas. Nosotros encontramos que en mezclas de sueros sin ictericia, lipemia o hemolisis visibles, el blanco de muestra presenta absorbancias a 340 nm que corresponden a aproximadamente 10 mg/dl. Neese (3) reporta datos congruentes con nuestras observaciones; encontró que los blancos de muestra dan lecturas equivalentes a 7 y hasta 20 ó 30 mg/dl. Otros investigadores reportan valores semejantes (2).

En los métodos enzimáticos, los restos de detergente causan interferencia, por lo que no recomendamos su uso. Si se utilizan en el lavado de la cristalería, deben eliminarse completamente enjuagando repetidamente con agua destilada.

En conclusión, aunque el método de la o-toluidina constituyó una excelente alternativa para sustituir a los métodos como el de Somogyi-Nelson (2), en la actualidad existen otras posibilidades mejores para la determinación de glucosa sérica. En el presente trabajo se demuestran los problemas de exactitud inherentes al método; además desde el punto de vista práctico, las quejas de los analistas aumentan conforme aumenta el número de análisis de glucosa en los laboratorios, ya que se hacen más frecuentes las quemaduras e irritaciones producidas por el reactivo. Con respecto al método del ferricianuro, su desempeño es satisfactorio a pesar de su escasa linealidad y de que son varias las sustancias que producen interferencia. Con respecto a los métodos enzimáticos evaluados, ambos son exactos y de ejecución sencilla, sin embargo, consideramos que el de la glucosa oxi-

dasa representa una mejor alternativa que el de la hexoquinasa para el trabajo de rutina en nuestro medio. Esto se debe a que el primero presenta la ventaja de que sus reactivos son más baratos y estables (6 meses o más a 4 °C) y además las lecturas espectrofotométricas se llevan a cabo dentro del espectro de luz visible. En el método de la hexoquinasa el reactivo reconstituido tiene una estabilidad de 24 horas a 4°C y las lecturas de absorbancia se llevan a cabo a 340 nm.

ABSTRACT

The accuracy of four methods for serum glucose determination was investigated by means of recovery and interference experiments. The chosen methods were: a manual o-toluidine, an automated ferricyanide technique and two commercial manual enzymatic procedures, one using hexokinase and the other, a colorimetric glucose oxydase. Recovery was satisfactory in all procedures but with the O-toluidine method was limited to 300 mg/dl, while linearity using an aqueous glucose standard solution was obtained up to 600 mg/dl.

In this method, major interferences were produced by galactose, mannose and uric acid; minor interferences were seen by fructose, salicylates and bilirubin. With the ferricyanide method; a strong interference was produced by fructose,

galactose and ascorbic acid; creatinine, manose and salicylates produced a weak interference. With the glucose oxydase method, a mayor interference was produced solely by ascorbic acid, and with the hexokinase method, only fructose produced a minor interference.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brilla, E., Schosinsky, K., Esquivel, J.M. y Cavaría, M. Cuantificación de la glucosa por el método de la otoluidina. *Act. Méd. Cost.* 1977; 20:18-23.
2. Caraway, W.T. Carbohydrates En Tietz, N.W., *Editor, Fundamentals of Clinical Chemistry.* W.B. Saunders Company. Philadelphia 1976; 234-263.
3. Neese, J.W. Glucose, direct hexokinase method. *Selected Methods for the small clinical chemistry laboratory.* 1982; 9:241-248.
4. Passey, R.B., Gillum, R.L., Fuller, J.B., Urry, F.M. y Giles, M.L. Evaluation and comparison of glucose methods and the proposed product class standard (1974). *Selected Methods of Clinical Chemistry,* 1977; 8:9-19
5. Schosinsky, K., Vargas, M., Vinocour, E., González, O.M., Brilla, E. y Gutiérrez, A. *Manual de Técnicas de Laboratorio.* VII Ed., Editorial Universidad de Costa Rica. San José. 1983; 100- 102.
6. Trinder, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.* 1969; 6:24-27.
7. Westgard, J.O. y Hunt, M.R. Use and interpretation of common statistical tests in method-comparison studies. *Clin. Chem* 1973; 19:49-57.

CUADRO 1

RECUPERACIÓN DE GLUCOSA AGREGADA A SUERO POR CUATRO MÉTODOS

Glucosa Agregada (a) (mg/dl)	Recuperación ^(b) (porcentaje)			
	O-toluidina	Ferricianuro	Gluc. oxidasa	Hexoquinasa
50	100,6	99,5	100,0	100,0
100	98,6	99,6	94,9	103,3
150	—	101,7	—	—
200	95,8	—	99,7	—
300	93,9	—	101,0	100,2
400	94,7	—	101,9	101,2
Recuperación Promedio	96,7	100,3	99,5	101,2

^(a) El valor basal de glucosa en el suero utilizado para los estudios de recuperación fue 107, 145, 117 y 114 mg/dl para los métodos de la o-toluidina, ferricianuro, glucosa oxidasa y hexoquinasa respectivamente.

^(b) El porcentaje de recuperación se calculó como:

$$\frac{\text{valor observado}}{\text{valor esperado}} \times 100$$

El valor esperado igual a la suma del valor basal más el agregado.

CUADRO 2
EFFECTO INTERFERENTE DE ANTICOAGULANTES
EN LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA POR CUATRO MÉTODOS (a)

Anti-coagulante	Cantidad de anticoagulante por cada 9 ml de sangre(b)	Método			
		O-toluidina	Ferricianuro	Glucosa oxidasa	Hexoquinasa
Fluoruro de Sodio	90 mg	0	0	1	1
EDTA Disódico	13,5mg	7	0	5	4
Heparina	1,35mg	1	0	1	5
Oxalato de Sodio	1 ml(0,1 mol/l)	1	0	-3	-1
Citrato de Sodio	1 ml (3,8 g/dl)	1	-2	-2	1

(a) La interferencia se expresa como diferencia en mg de glucosa/dl entre suero y plasma.

(b) Se empleó sangre con aproximadamente 100 mg/dl de glucosa sérica.

CUADRO 3
EFFECTO INTERFERENTE DE VARIAS SUSTANCIAS EN LA DETERMINACIÓN
DE GLUCOSA POR CUATRO MÉTODOS (a)

Sustancia	Método			
	O-toluidina	Ferricianuro	Gluc. oxidasa	Hexoquinasa
Fructosa	14	123	0	25
Galactosa	134	83	0	0
Manosa	91	50	8	0
Bilirrubina	36	0	-33	25 ^(b)
Hemoglobina	0	-3	1	6 ^(b)
Triglicéridos	1	^(c)	36 ^(ch)	30 ^(ch)
Creatinina	0	50	0	0
Ácido úrico	-92	0	0	0
Ácido ascórbico	0	108	-100	0
Salicilatos	-14	8	8	0

(a) La interferencia se expresa en porcentaje.

La interferencia positiva indica los mg de glucosa no presentes en el suero, que se cuantificaron al agregar 100 mg de sustancia. La interferencia negativa (-) debe interpretarse como mg de glucosa presentes en el suero que no se cuantificaron en presencia de 100 mg de sustancia. Experimentalmente se agregaron diferentes cantidades de cada sustancia dentro de los límites fisiopatológicos y se calculó el porcentaje de interferencia en promedio.

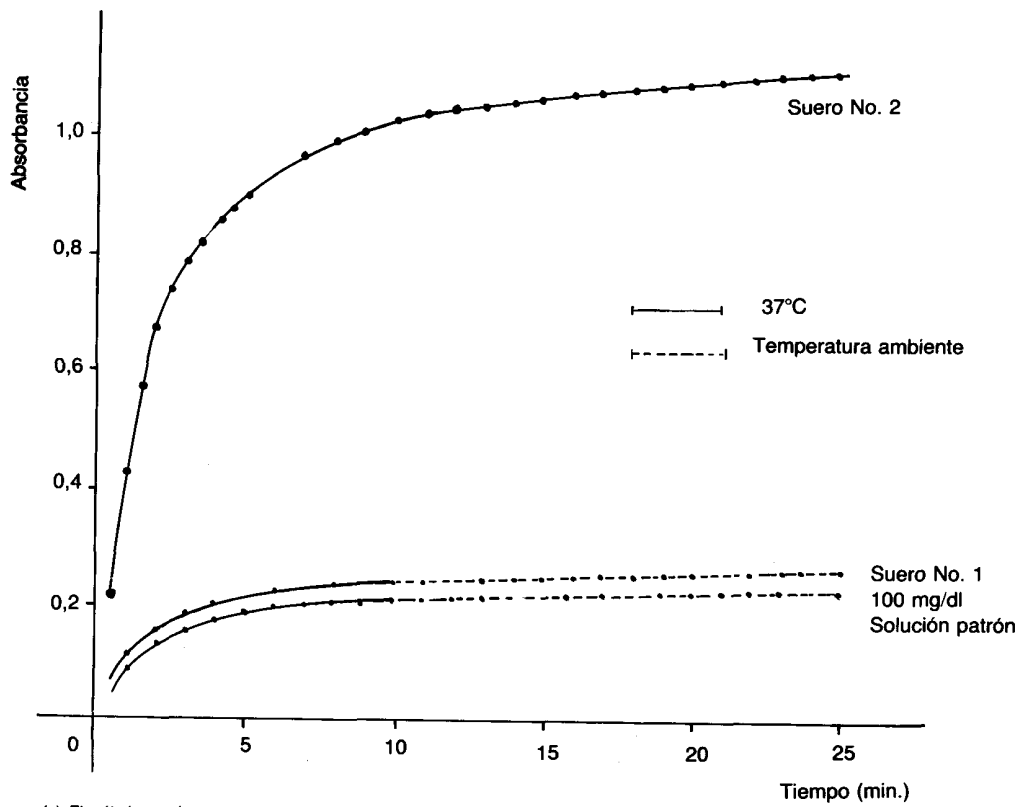
(b) Corrige con blanco de muestra.

(c) Sueros lipémicos no se analizan por obstruir la membrana en el autoanalizador.

(ch) Con blanco de muestra la interferencia se reduce a 2 mg/100 mg.

FIGURA 1

DESARROLLO Y ESTABILIDAD DEL PRODUCTO FINAL COLOREADO EN LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA OXIDASA (a)



(a) El método consiste en 10 minutos de incubación a 37°C y posterior lectura de absorbancia a temperatura ambiente.