

Errores sistemáticos en la determinación de triglicéridos

Miguel Rodríguez-Manotas^a, Manuel Amorín^a, María Inmaculada Viñals^a, Rafael Gomis^b, Ascensión López^a, Ignacio Sánchez-Serrano^a, Francisco Machado^a y José Herrera^a

^aLaboratorio. Hospital Comarcal del Noroeste. Caravaca de la Cruz. Servicio Murciano de Salud. Murcia.

^bServicio de Planificación y Financiación Sanitaria. Servicio Murciano de Salud. Murcia. España.

Correspondencia: Miguel Rodríguez Manotas.
C/ Peña del Gato, 22. 30400 Caravaca de la Cruz.
Murcia. España.
Correo electrónico: MMANOTAS@terra.es

Resumen

Objetivos: Búsqueda de errores sistemáticos en la medida de las concentraciones de triglicéridos. Valoración de su importancia para el diagnóstico y control del paciente, en virtud de las recomendaciones del National Cholesterol Education Program: Adult Treatment Panel III.

Material y métodos: Se plantearon 2 procedimientos para detectar errores de exactitud en la medida de triglicéridos, mediante los métodos con y sin blanco de glicerol. Por un lado, el análisis independiente que consistió en el análisis en paralelo de 116 muestras de suero obtenidas por muestreo aleatorio en el mes de diciembre de 2002 mediante 2 métodos, uno de ellos de fiabilidad garantizada. Por otro, se preparó una muestra patrón para valorar en ella la concentración equivalente de triglicéridos por ambos métodos.

Procesamiento estadístico de resultados.

Resultados: Se detectó un error sistemático o determinado positivo en la medida de triglicéridos con blanco de glicerol: a) la valoración del análisis independiente arrojó una diferencia positiva constante de 0,110 mmol/l; b) el análisis de las muestras patrón por el método MCB estableció un intervalo de confianza de 8,5-8,7 mmol/l, que no incluyó la concentración teórica calculada para las muestras patrón, 8,4 mmol/l.

Conclusiones: El error sistemático encontrado, aunque no sorprende por su valor absoluto ($\geq 5\%$), tiene importancia por presentar signo positivo respecto a la determinación de triglicéridos sin tener en cuenta el blanco de glicerol.

Palabras clave: Triglicéridos/análisis. Triglicéridos/sangre. Patrones de referencia. Control de calidad. Interpretación de datos. Estadística.

Abstract

Objectives: To identify systematic bias in triglyceride determinations and assess its importance in patient diagnosis and management, according to the recommendations of the National Cholesterol Education Program: Adult Treatment Panel III.

Material and methods: Two procedures to detect accuracy errors in triglyceride measurements with and without glycerol-blanking were carried out. On the one hand, independent analysis, which consisted of parallel analysis of 116 serum samples obtained by random sampling in December 2002 using two methods, one of which was of proven reliability, was performed. On the other hand a standard sample was prepared to test the equivalent triglyceride concentration using both methods. Statistical processing of the results was performed

Results: Systematic positive bias was detected when measuring glycerol-blanked triglycerides: a) independent analysis yielded a positive constant difference of 0.110 mmol/L; b) analysis of the standard sample performed by the MCB method established a confidence interval (8.5-8.7 mmol/L) that did not include the theoretical concentration calculated for the standard samples (8.4 mmol/L).

Conclusions: Although its absolute value was low ($\geq 5\%$), the systematic bias detected was important because it showed a positive sign versus unblanked triglycerides.

Key words: Triglycerides/analysis. Triglycerides/blood. Reference standards. Quality control. Data interpretation. Statistics.

Introducción

Uno de los objetivos de calidad perseguidos por los laboratorios, estriba en la utilización de técnicas analíticas que cumplan las exigencias de exactitud y precisión establecidas¹. Para cada parámetro bioquímico, estas exigencias dependen de su repercusión para realizar un diagnóstico, un pronóstico o instaurar y seguir un tratamiento.

Las dislipemias son un importante factor de riesgo vascular, y los triglicéridos (TG) tienen un creciente interés e implicaciones en ellas. La elevación de los TG en situaciones específicas, como el síndrome metabólico (asociado a diabetes mellitus, hipertensión y estado procoagulante), su influencia en la resistencia insulínica y sus implicaciones terapéuti-

cas para evitar la aterogénesis en estos pacientes, revelan la importancia de una medición fiable^{2,3}. Especialmente importante es la medida exacta de las concentraciones de TG tras ayuno para el diagnóstico de la dislipemia aterogénica, junto con la medida del cHDL⁴ (colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad).

Las concentraciones de cLDL (colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad), que se obtienen mediante la fórmula de Friedewald⁵, dependen de la concentración de TG. La fórmula se basa, fundamentalmente, en asumir que las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) mantienen una proporción entre colesterol y triglicéridos, la media estimada de esta proporción es aproximadamente de 0,2. El cLDL se deduce del colesterol total de la siguiente forma:

$$cLDL = \text{colesterol total} - cHDL - TG \times 0,2 \text{ (todo en mg/dl)}$$

Actualmente, existen 2 tipos de métodos para determinar los TG: métodos de medición de TG sin blanco de glicerol (MSB) y con blanco de glicerol (MCB). Dadas sus características, se esperan mayores concentraciones de TG en los resultados de MSB frente a MCB⁶. Tras inspeccionar los valores esperados de TG de un suero control interno proporcionado por el proveedor Beckman Coulter, Inc.), dentro del programa de calidad de nuestro laboratorio, se observó que este hecho no se cumplía. Las concentraciones mostradas eran paradójicamente más elevadas para el MCB que para el MSB. Estos antecedentes motivaron la realización de un estudio con objeto de determinar la exactitud en la medida de TG en suero y su repercusión posterior.

Material y métodos

Se plantearon 2 procedimientos para verificar la existencia de errores en la medida de TG mediante los métodos MSB y MCB. Por un lado, el análisis independiente, que consiste en el análisis de la muestra con un método distinto de fiabilidad garantizada o método de referencia, y por otro el análisis de muestras patrón⁷, que son muestras sintéticas cuya composición se conoce y es muy parecida o igual a la del suero para el que se ensaya el análisis. Las muestras patrón deben prepararse cuidadosamente para asegurar que la concentración de la sustancia que hay que analizar se conozca con un alto grado de pureza.

Procedimiento analítico I: determinación de triglicéridos en muestras de suero

La determinación de TG en muestras de suero se realizó en nuestro laboratorio mediante sistemas SYNCHRON® LX (Beckman Coulter, Inc.) a partir de la cuantificación de glicerol que se libera tras la hidrólisis con lipasa (MSB). Dado que las muestras de suero inicialmente presentan ciertas concentraciones de glicerol endógeno, conviene realizar la medida previa de éstas para restarla (MCB). Se trata de métodos enzimáticos que utilizan la enzima glicerofosfatooxidasa⁸⁻¹⁰ (fig. 1). La diferencia entre ellos estriba en que la lipasa (reacción [a] de la figura 1) se añade más tarde en el MCB, cuando ya se ha agotado todo el glicerol endógeno. Los métodos de los

sistemas SYNCHRON® LX para la determinación de TG proporcionan un rango analítico lineal de 0,1 a 11,3 mmol/l¹¹.

Se realizó un muestreo aleatorio a lo largo del mes de diciembre de 2002 de 116 muestras de suero, todas procedentes de pacientes ambulatorios atendidos en nuestro medio. No se tuvo en cuenta la edad, el sexo ni el diagnóstico previo de los pacientes estudiados, ya que estas variables no influyen *a priori* en los métodos a evaluar.

Para cada muestra se cuantificaron las concentraciones de TG por ambos métodos.

Procedimiento analítico II: determinación del glicerol de las muestras patrón

A falta de un método de referencia disponible, se contrastaron los 2 métodos con una solución preparada a partir de glicerol de densidad y pureza conocidas (en el esquema de la figura 1 se puede observar que 1 mol de "glicéridos" equivale a 1 mol de glicerol). El método de referencia propuesto por el Cholesterol Reference Method Laboratory Network (CRMLN) de los Centers for Disease Control (CDC), necesario para poder contrastar los métodos referidos, no se encuentra disponible en la mayoría de laboratorios por resultar poco practicable⁶. En ellos se extraen con cloroformo los TG de interferentes hidrosolubles, como el glicerol, y se eliminan los fosfolípidos con ácido sílico. De este modo, sólo se cuantifican los "glicéridos" (mono, di y triglicéridos)^{12,13}.

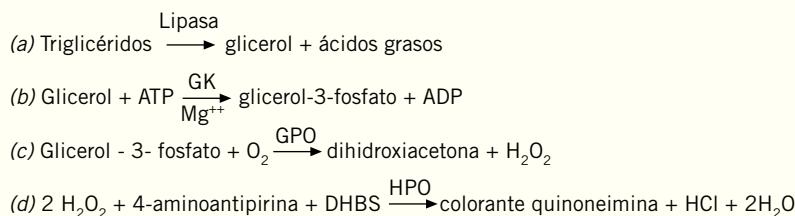
Para eliminar posibles errores estadísticos en la preparación de las muestras patrón, se prepararon 5 soluciones distintas a la misma concentración (8,4 mmol/l). La sustancia patrón¹⁴, utilizada para preparar las muestras patrón, contenía un 98% de glicerol, una densidad de 1,26 kg/l, y una masa molecular de 92,09 g/mol (QUIMON S.A., Montplet & Esteban).

Cada solución fue valorada con cada método, y se repitió 10 veces la medida (SYNCHRON® LX).

Análisis estadístico

Los resultados de las mediciones de TG con ambos métodos se compararon mediante el método de Passing-Bablok¹⁵, una regresión lineal no paramétrica, dado que los resultados obtenidos no seguían una distribución normal (comprobado previamente por el método de Kolmogorow-Smirnoff).

Figura 1. Esquema de las reacciones químicas.



ADP: adenosín difosfato; ATP: adenosín trifosfato; DHBS: 3,5-dicloro-2-hidroxibenzeno sulfórico; GK: glicerolcinasa; GPO: glucerofosfato oxidasa; HPO: peroxidasa de rábano picante.

Se calculó la media, desviación estándar y ponderada de las 5 muestras patrón, para cada método, así como el intervalo de confianza, expresados entre paréntesis.

Resultados

La figura 2 refleja los resultados del análisis de Passing-Bablok. Todos los valores se distribuyen por encima de la línea de identidad. Se detecta una diferencia sistemática positiva constante (tiene siempre la misma magnitud, aun cuando cambie la concentración de la sustancia que hay que analizar, coincide con el término constante de la regresión lineal), en torno a 0,110 mmol/l que se extrae del análisis de Passing-Bablok (concordancia Passing-Bablok: $r = 0,998$; $Y = 1.000 [0,993 - 1,018] X + 0,110 [0,099 - 0,123]$; $p < 0,05$; donde Y y X representan concentración de TG en mmol/l, con y sin blanco de glicerol, respectivamente). El gráfico de diferencias de la figura 3 también muestra una diferencia positiva en favor de los TG con blanco de glicerol.

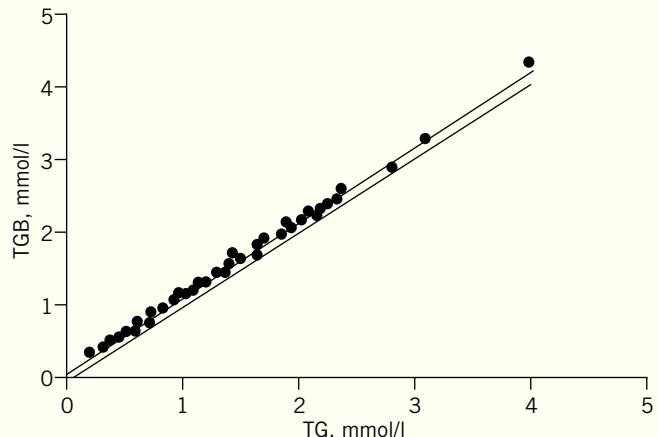
La valoración de las muestras patrón de glicerol por el método con blanco de glicerol arrojó un resultado de 8,6 (8,5-8,7) mmol/l, mientras que el resultado sin blanco fue de 8,4 (8,2-8,6) mmol/l.

Discusión

Los requisitos de calidad para la medida de las concentraciones de TG continúan siendo menos estrictos que los exigidos en la determinación de las concentraciones de colesterol total⁴, a pesar de que la concentración en suero o plasma de los TG parece constituir un factor de riesgo cardiovascular independiente del resto de magnitudes lipídicas (ya que las lipoproteínas remanentes presentes en la dislipemia aterogénica, ricas en triglicéridos, son aterogénicas *per se*)^{16,17}. La calidad analítica se define en términos aceptados de inexactitud (diferencia numérica entre el valor medio de una serie de determinaciones y el valor verdadero, referida al valor verdadero), imprecisión (desviación o coeficiente de variación de un conjunto de medidas repetidas) y las limitaciones impuestas al error global en la medida. En sus recomendaciones de 1995, el National Cholesterol Education Program (NCEP) define los requerimientos de calidad que deberían acompañar a las medidas de TG: el error total de las medidas de TG debería ser inferior al 15%, con una inexactitud o error relativo $\leq 5\%$ y una imprecisión $\leq 5\%$ ^{18,19}.

El error sistemático o determinado (error que da lugar a una desviación, siempre en el mismo sentido, de los resultados obtenidos respecto al valor verdadero), cometido al no sustraer el blanco de glicerol, generalmente no es muy grande, excepto para los casos en los que el glicerol endógeno se encuentra anormalmente elevado²⁰. Se ha demostrado que aproximadamente un 4% de los pacientes ambulatorios y un 12% de los ingresados presentan concentraciones de glicerol libre tan elevadas que puedan falsear en más de un 10% la concentración de TG^{21,22}. En ausencia de otro tipo de error sistemático, al tratarse de muestras ambulatorias, sólo 4 de

Figura 2. Test de concordancia, Passing-Bablok ($n = 116$).



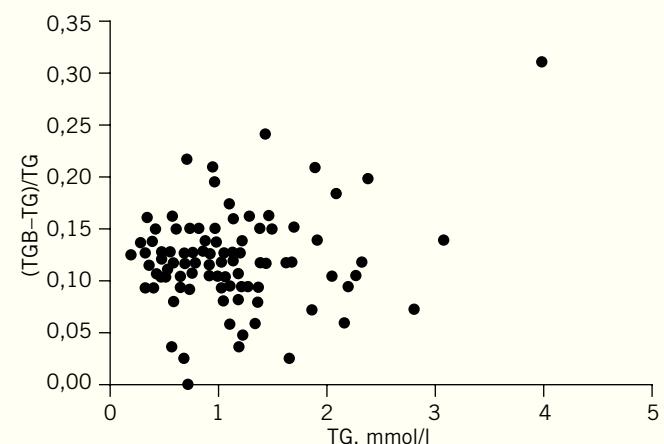
Pendiente: 1,000 (0,993 a 1,018); ordenada de origen: 0,110 (0,099 a 0,123); TGB: triglicéridos con blanco. TG: triglicéridos sin blanco.

cada 100 muestras estudiadas presentarían una diferencia en la concentración de TG determinada por el método MCB respecto al MSB, y ésta sería negativa.

La diferencia sistemática detectada en el presente estudio no sorprende por su valor absoluto, que supera el límite de exactitud permitido (5% para una hipotética muestra con concentraciones de TG por encima del límite alto: 2,26 mmol/l y superior al 5% para concentraciones inferiores al límite), sino por su signo positivo (debería ser negativo como se ha dicho anteriormente).

Los resultados obtenidos del análisis de las muestras patrón de glicerol por ambos métodos establecieron un intervalo de confianza (IC) para cada uno. Se valoró cuál de ellos incluía a la concentración teórica. Dicha concentración (8,4 mmol/l), precalculada a partir de los datos de pureza, densidad y peso molecular del glicerol, y volumen final de la mues-

Figura 3. Gráfico de diferencias relativas, $n = 116$.



Diferencia media: 0,117 (0,109-0,124); TGB: triglicéridos con blanco; TG: triglicéridos sin blanco.

tra patrón, está contenida dentro del IC del método MSB (con una probabilidad > 0,95) y no está contenida dentro del método MCB ($p > 0,95$). Estos resultados dan validez a los que se obtuvieron para el MSB del "Procedimiento analítico I", donde se contrastó el método MCB frente al MSB. También sirve para verificar la existencia de un error determinado de signo positivo en el método con blanco de glicerol, en torno a esa concentración (8,4 mmol/l). Por desgracia, el error asociado a los instrumentos volumétricos hizo desaconsejable la preparación de otras soluciones o muestras patrón (se necesitaba una dilución adicional) para poder abarcar todo el rango analítico, ésta fue la limitación más importante del estudio de exactitud.

En cuanto a la aportación de la concentración de TG al cálculo del cLDL: las concentraciones de TG (expresadas en mg/dl) sólo contribuyen con 1/5 (o 0,2) de su valor al del cLDL, las cifras significativas inherentes al producto TG x 0,2 vienen limitadas por las del coeficiente y enmascararían el error constante detectado para valores elevados de TG, que son los que nos interesan. El error inherente al uso de la fórmula de Friedewald, que supone un error superior a $\pm 4\%$, no limita su uso.

Se confirma la existencia del error sistemático detectado en la medida de las concentraciones de TG mediante el MCB. El error tiene consecuencias negativas inmediatas: a) en el diagnóstico de la dislipemia aterogénica, dentro del síndrome metabólico (concentraciones en suero de cHDL ≤ 40 mg/dl, y de TG ≥ 150 mg/dl); b) para el clínico al suministrar una información errónea que conduciría a la aplicación de un tratamiento hipolipemiante mal dirigido⁴.

El hecho de detectar y demostrar la existencia de error sistemático de signo positivo en la determinación de las concentraciones de TG con blanco de glicerol debería servir para su pronta corrección. Esta medida resulta de obligada necesidad para que podamos continuar adoptando otra de las recomendaciones del NCEP¹⁷, que propone la creación de pruebas reflejas de TG con blanco de glicerol para aquellas muestras que superen 2,26 mmol/l de TG sin blanco.

Agradecimiento

Este trabajo no se podría haber realizado sin la inestimable ayuda de Joaquín Maquilón Castaño, M. Dolores Rodríguez Martínez y Carmen López Rueda.

Bibliografía

- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples. Approved Guideline, NCCLS publication EP9-A, Villanova, PA, 1995.
- Grundy SM. Hypertriglyceridemia, atherogenic dyslipidemia and metabolic syndrome. *Am J Cardiol* 1998;81:18-25.
- Axelsen M, Smith U, Eriksson JW, Taskinen MR, Jansson PA. Postprandial hypertriglyceridemia and insulin resistance in normoglycemic first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Ann Intern Med* 1999;131:27-31.
- National Cholesterol Education Program. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP): Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). National Institutes of Health, 2002. Disponible en: <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/cholesterol/index.htm>
- Friedewald WT, Levy RI, Frederickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18:499-502.
- Burtis CA, Ashwood ER, editors. *Tietz textbook of clinical chemistry*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1999.
- Skoog DA, West DM. *Química Analítica*. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España S.A., 1989.
- Bucolo G, David H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem* 1973;19:476.
- Pinter JK, Hayashi JA, Watson JA. Enzymic assay of glycerol, dihydroxyacetone and glyceraldehydes. *Arch Biochem Biophys* 1965;121:404.
- McGowan MW, Artiss JD, Strandbergh DR, Zak B. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin Chem* 1983;29:538-42.
- Manual de Información Química. Sistemas SYNCHRON LX 962403, Mayo 2000.
- Centers for Disease Controls. Semiautomated Procedure for Determination of Triglycerides in Serum as Performed in Lipid Standardization Laboratory. Atlanta: Centers for Disease Control, 1973.
- Myers GL, Cooper GR, Winn CL, Smith SJ. The Centers for Disease Control-National Heart, Lung and Blood Institute Lipid Standardization Program: an approach to accurate and precise lipid measurements. *Clin Lab Med* 1989;9:105-35.
- Valcárcel M, Ríos A. *La calidad en los laboratorios analíticos*. Barcelona: Editorial Reverté, 1992.
- Passing H, Bablok W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983;21:709-20.
- Austin MA, Hokanson JE, Edwards KL. Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol* 1998;81:7-12.
- Assmann G, Schulte H, Funke H, Von Eckardstein A. The emergence of triglycerides as a significant independent risk factor in coronary artery disease. *Eur Heart J* 1998;19:8-14.
- National Cholesterol Education Program. Recommendations on Lipoprotein Measurements: From the Working Group on Lipoprotein Measurement. NIH/NHLBI NIH Publication N.º 95-3044. Bethesda, MD: National Institutes of Health, 1995.
- Stein EA, Myers GL. National cholesterol education program recommendations for triglycerides measurement: executive summary. *Clin Chem* 1995;41:1421-6.
- McCabe ERB. Disorders of glycerol metabolism. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases*. 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995.
- Cole TG. Glycerol Blanking Triglycerides Assays: is it necessary? *Clin Chem* 1990;36:1267-8.
- Jessen RH. Do Enzymatic Analyses of Serum Triglycerides Really Need Blanking for Free Glycerol? *Clin Chem* 1990;36: 1372-5.