

Transferencia de intervalos de referencia de C3, C4 e inhibidor de C1

► Graciela Susana Etcheverry¹, Catalina Beatriz De Marco², Juan Antonio Verna^{3*}

1. Bioquímica. Magister en Economía de la Salud y Administración de Organizaciones de Salud.

2. Bioquímica.

3. Bioquímico. Magister en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

* Hospital Interzonal General de Agudos "Gral. San Martín". Servicio de Laboratorio Central. Calles 1 y 70. La Plata. C. P.: 1900. Provincia de Buenos Aires. Argentina.

Resumen

Ante la necesidad de contar con una valoración más certera en la evaluación de los resultados de muestras que requieren el estudio de los componentes del complemento C3, C4 e inhibidor de C1, este trabajo tuvo por objetivo verificar la factibilidad de transferencia de los intervalos de referencia establecidos por el fabricante para las mencionadas proteínas. Para ello, se seleccionaron sueros de adultos que concurren a realizarse el estudio prenupcial al Servicio de Laboratorio del Hospital. Los dosajes de C3 y C4 se realizaron por nefelometría cinética y los de Inhibidor de C1 por inmunodifusión radial. Para la aceptabilidad en la transferencia del intervalo de referencia de C3, C4 e inhibidor de C1 se aplicó un algoritmo de decisiones. Los intervalos de referencia propuestos por el fabricante para C3 y C4 resultaron transferibles a este laboratorio, siendo los porcentajes de inclusión de 96% y 100% respectivamente. Por el contrario, el intervalo de referencia propuesto por el fabricante para inhibidor de C1 no resultó transferible a la población del laboratorio.

Palabras clave: transferencia * intervalo de referencia * complemento * proteínas

Summary

TRANSFERENCE OF REFERENCE INTERVALS FOR C3, C4 AND C1 INHIBITOR.

Given the need to reach a more precise evaluation of results in analyses of samples that require the study of the C3 and C4 components of complement as well as the C1 inhibitor, this work had as an objective to verify the feasibility of interval-of-reference transfers as specified by vendor for the afore-mentioned proteins. For this purpose, the sera from adults that turned up for prenuptial tests at the Hospital Laboratory Service was selected. C3 and C4 were measured by means of kinetic nephelometry and the C1 inhibitor by means of radial immunodiffusion. To ensure acceptability of the interval-of-reference transfer for C3, C4 and the C1 inhibitor, a decision algorithm was used. The intervals of reference proposed by the manufacturer for C3 and C4 proved to be transferable to the lab, with inclusion percentages of 96 and 100, respectively. On the other hand, the interval of reference proposed by the manufacturer for the C1 inhibitor proved not to be transferable to the lab population.

Key words: transference * interval of reference * complement * proteins

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

Introducción

Del conjunto de pruebas disponibles para evaluar los niveles de proteínas del complemento, se efectúan en el Laboratorio del hospital las determinaciones de C3, C4 e inhibidor de C1. Los resultados de dichas determinaciones eran referidos a los intervalos de referencia propuestos por los fabricantes. La posibilidad de obtener intervalos de referencia para la población atendida en el hospital permitiría una valoración más certera de estos parámetros. En este sentido la Norma C28-A (1) establece que el número mínimo de especímenes a considerar es de 120.

En vista de la actual coyuntura económica, la aplicación de la norma mencionada resultaba onerosa por lo que se decidió realizar una verificación del intervalo de referencia provisto por el fabricante. Se denomina de esta manera al procedimiento que permite establecer la factibilidad de transferencia del intervalo de referencia establecido por el fabricante de un equipo diagnóstico o de otro tipo de bibliografía, al laboratorio (1). Para realizarlo debe evaluarse un número mínimo de 20 especímenes (2). La verificación es necesaria debido a que frecuentemente los intervalos de referencia que proveen los fabricantes no se adecuan a la población de pacientes. Este procedimiento forma parte de la garantía de calidad, encuadrada en las buenas prácticas de laboratorio (3).

En el mismo sentido, los dosajes de C3 y C4 se realizaron durante años en el Laboratorio por metodología de inmunodifusión radial. El cambio de dicha metodología de trabajo por nefelometría contribuyó a la necesidad de verificar los intervalos de referencia provistos por los fabricantes.

Respecto a la determinación de inhibidor de C1, la misma se realiza por inmunodifusión radial. Dado que no se contaba con intervalos de referencia creados ni verificados para este último analito, su verificación en forma conjunta con C3 y C4 permitiría asegurar resultados más representativos y fidedignos. De esta forma la toma de decisiones clínicas sobre la base de estos resultados redundará en un mayor beneficio para los pacientes que concurren a este laboratorio.

Materiales y Métodos

POBLACIÓN DE REFERENCIA

En el período comprendido entre marzo de 2001 y noviembre de 2002 se seleccionaron sueros de adultos que concurren a realizarse el estudio prenupcial al Servicio de Laboratorio. El mencionado estudio incluye un chequeo médico y la realización del *test* VDRL (Venereal Disease Research Laboratory). Las condiciones

de edad, ayuno y no tener enfermedad aparente de la noción de estado de referencia se utilizaron como criterio de inclusión (4).

Para la verificación de los rangos de C3 y C4 se procesaron 26 y 29 muestras, respectivamente, pertenecientes a adultos de ambos sexos. Para la determinación de inhibidor de C1 se procesaron las muestras de 86 adultos, 29 de sexo masculino y 57 de sexo femenino. Estas últimas se procesaron en dos etapas, 29 en la primera etapa y 28 en la segunda etapa.

METODOLOGÍA

Los dosajes de C3 y C4 se realizaron por nefelometría cinética con reactivos Dade Behring en un nefelómetro BN100 (Marburg, Alemania) y los de inhibidor de C1 por inmunodifusión radial (The Binding Site).

Las muestras se sometieron a control de calidad interno con sueros controles provistos por los fabricantes. En el caso de C3 y C4 se contó con la evaluación externa de calidad del PEEC (Programa de Evaluación Externa de Calidad de la Fundación Bioquímica Argentina).

VERIFICACIÓN DE LOS INTERVALOS DE REFERENCIA

Para la aceptabilidad en la transferencia del intervalo de referencia de C3, C4 e inhibidor de C1 se aplicó el algoritmo de decisiones propuesto por F. Ventimiglia y N. Fink (2) (Figura 1).

En concordancia con el mencionado algoritmo se consideraron los siguientes criterios:

1. Se estudió la distribución de valores de la población mediante histogramas de frecuencia para cada analito (2).
2. Detección de valores marginales (2): se utilizaron:
 - a) Las fórmulas:
 - 1) $q_3 + 1.5(q_3 - q_1)$
 - 2) $q_1 - 1.5(q_3 - q_1)$
 donde q_1 y q_3 son los cuartiles 25 % y 75 % respectivamente. Se descartaron los valores mayores a 1) o menores a 2).
 - b) *Test* de Dixon (1). Se descartaron los valores marginales según Reed y col. (5).
3. Cálculo del rango: se realizó determinando los percentiles 2.5% ($p_{2,5}$) y 97.5% ($p_{97,5}$) mediante las siguientes expresiones:

Límite inferior de referencia ($p_{,5}$) = $0.025(n+1)$
 Límite superior de referencia ($p_{97,5}$) = $0.975(n+1)$
 donde n es el número de valores después de eliminar los datos marginales según el punto 2.
4. Comparación de los valores obtenidos con los aportados por el fabricante: esta comparación se realizó aplicando los siguientes elementos:

- a) Determinación del porcentaje de valores obtenidos por fuera del rango del fabricante (6).
 - b) Test de la t.
5. Examen del procedimiento analítico:
- a) Cálculo del Coeficiente de Variación Porcentual (CV %) intraensayo e interensayo. Para comparar los valores obtenidos con los de los fabricantes, en la determinación del CV intraensayo de inhibidor de C1 se utilizaron

- diámetros y en la determinación del CV interensayo se utilizaron concentraciones.
 - b) Comparación de las varianzas interensayo obtenidas con las aportadas por el fabricante (Prueba F de Snedecor).
6. Búsqueda en bibliografía de diferentes intervalos de referencia plausibles de ser transferidos a este Laboratorio y comparación con los valores obtenidos.
7. Determinación de un rango de referencia propio.

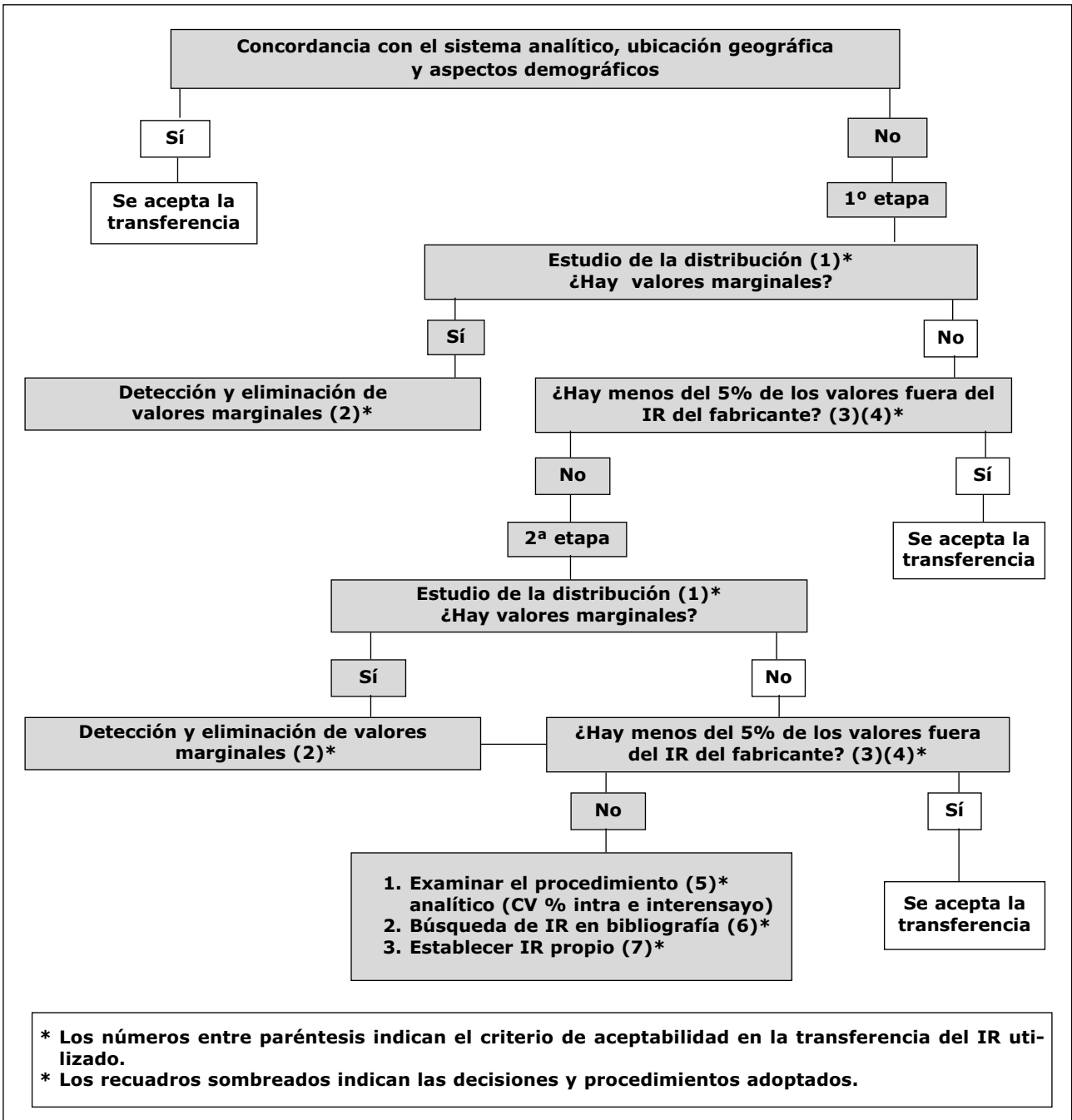


Figura 1. Algoritmo de Decisión.

Resultados

Los histogramas de frecuencia para los diferentes analitos presentaron distribuciones normales (criterio 1). (Figuras 2 a 7).

Los intervalos de referencia propuestos por el fabricante para C3 y C4 resultaron transferibles al laboratorio (Tabla I).

Por el contrario, el intervalo de referencia propuesto por el fabricante para inhibidor de C1 no resultó

transferible a la población que concurre al laboratorio (Tabla II). El examen del procedimiento analítico para este analito no arrojó diferencias respecto del realizado por el fabricante (Tabla III).

La búsqueda en bibliografía de otros intervalos de referencia y su comparación con los valores obtenidos para inhibidor de C1 no arrojó un resultado satisfactorio (criterio 6). Ordi-Ros (7) reporta un rango de 0,15-0,35 g/L utilizando sólo 50 especímenes. Los porcentajes de inclusión en este rango de los valores obtenidos

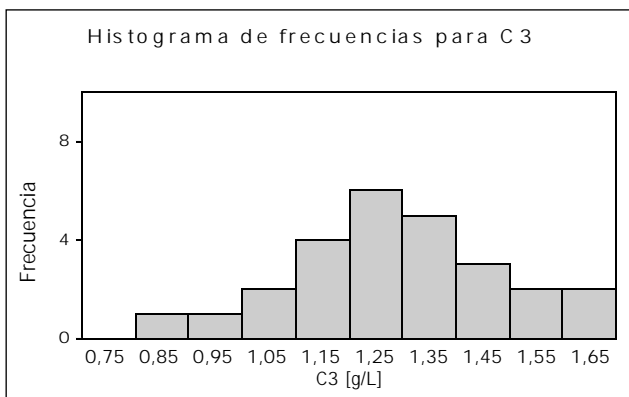


Figura 2.

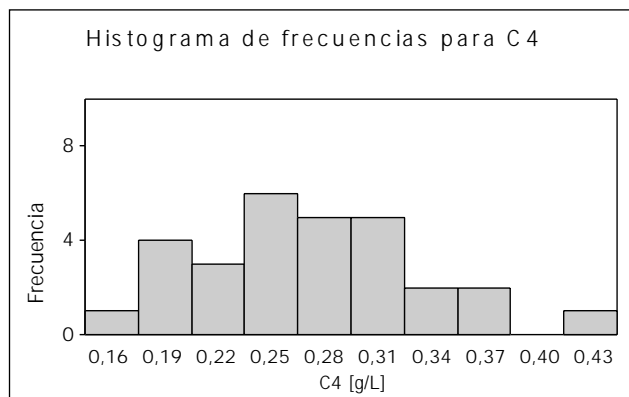


Figura 3.

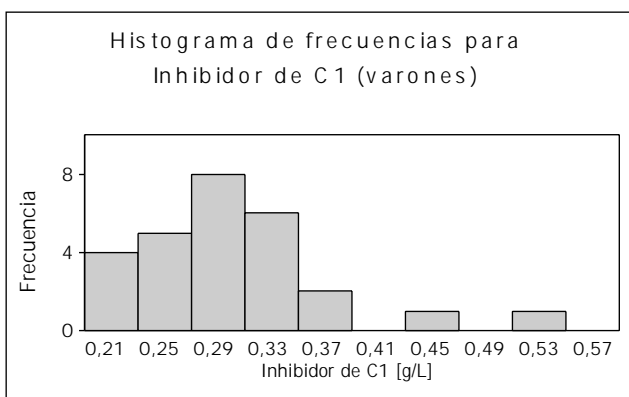


Figura 4.

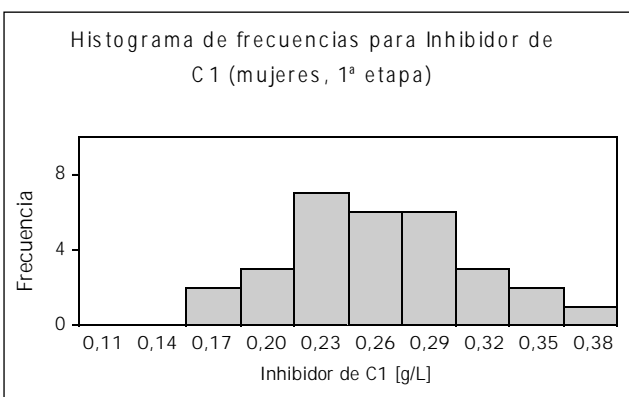


Figura 5.

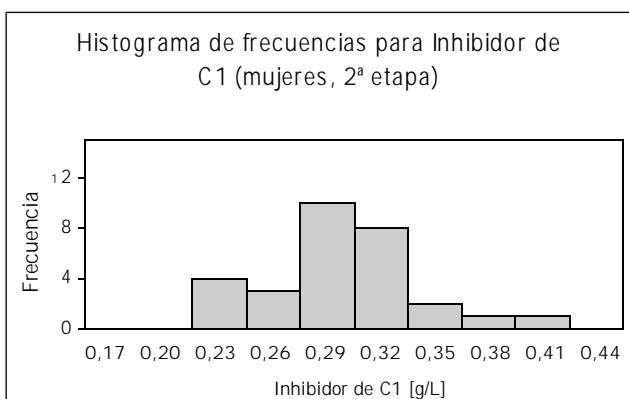


Figura 6.

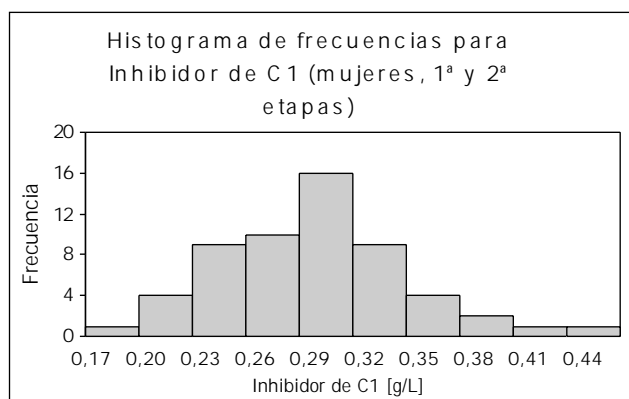


Figura 7.

Tabla I. Resultados de los criterios de aceptabilidad 2, 3 y 4 para C3 y C4.

	C3 (g/L)	C4 (g/L)
Número de muestras (criterios 2ª y 2b)*	26	28
Rango obtenido (criterio 3)	0,86-1,62	0,18-0,37
Rango fabricante	0,90-1,80	0,10-0,40
Porcentaje de inclusión en el rango del fabricante (criterio 4)	96%	100%
¿Se verifica el intervalo de referencia propuesto por los fabricantes?	Sí	Sí

* Después de eliminar valores marginales.

en este trabajo para la población de referencia de sexo femenino fueron 85% para la primera etapa y 92% para la segunda etapa, respectivamente. Para la población de referencia de sexo masculino el porcentaje de inclusión fue 96%. Por otra parte, los porcentajes de inclusión para la población de referencia de sexo femenino fueron 26% y 7,5%, para la primera y segunda etapa respectivamente, si se referían al rango 0,10-0,25 g/L propuesto por E. C. Jazwinska (8). Para la población de referencia de sexo masculino el porcentaje de inclusión en este último rango fue 24%.

Finalmente, dada la cantidad de valores utilizados en las dos etapas para la población de referencia de sexo femenino, se estableció un rango de referencia propio (criterio 7), calculado en forma no paramétrica. El rango obtenido fue: 0,18-0,39 g/L.

Para la población de referencia de sexo masculino se conservó el rango hallado (0,22-0,37 g/L) debido a

Tabla II. Resultados de los criterios de aceptabilidad 2, 3 y 4 para inhibidor de C1.

	Mujeres (g/L) primera etapa ^v	Mujeres (g/L) segunda etapa	Varones (g/L)
Número de muestras* (criterios 2a y 2b)	27	27	25
Media	0,267	0,289	0,29
Desviación estándar	0,052	0,038	0,043
Rango obtenido (criterio 3)	0,16-0,37	0,21-0,37	0,22-0,37
Rango del fabricante	0,27-0,40	0,27-0,40	0,30-0,41
Porcentaje de inclusión en el rango del fabricante (4 a)	41%	74%	40%
Número de muestras del fabricante	59	59	64
Media del fabricante	0,329	0,329	0,353
Desviación estándar del fabricante	0,033	0,033	0,034
t (grados de libertad), p < 0,05	(84) 6,666	(84) 5,000	(87) 7,325
t crítico (criterio 4b)	1,989	1,989	1,987
¿Se acepta la transferencia del IR del fabricante?	NO	NO	NO

* Después de eliminar valores marginales.

Tabla III. Resultados del criterio de aceptabilidad 5 para el inhibidor de C1.

	Intraensayo	Interensayo
N utilizado	6	6
N del fabricante	6	10
CV % obtenido (criterio 5a)	0,55	3,35
CV% del fabricante (criterio 5a)	0,92	2,00
¿El CV % obtenido es menor que el CV % del fabricante?	Sí	No
Desviación estándar obtenida	-	13,00
Desviación estándar del fabricante	-	7,74
F, p < 0,05 (criterio 5b)	-	2,82
F crítico (criterio 5b)	-	3,48
¿Hay diferencia estadísticamente significativa entre varianzas?	-	No

* Después de eliminar valores marginales.

razones presupuestarias que no permitieron disponer de determinaciones adicionales para ampliar el número de especímenes estudiados.

Discusión y Conclusiones

En el caso de los componentes de la cascada del complemento C3 y C4 se concluye que pueden transferirse los intervalos de referencia propuestos por el fabricante (Tabla I). Para estos dos analitos fue necesaria una sola etapa de acuerdo al algoritmo de la Figura 1. Debe destacarse que los porcentajes de inclusión de los valores obtenidos dentro de los intervalos propuestos por los fabricantes fueron altos (96% para C3 y 100% para C4).

Por el contrario, el intervalo de referencia de los fabricantes para el inhibidor de C1 no es transferible a la población del laboratorio (Tabla II) (Tabla III), si bien debe destacarse la existencia de correspondencia entre la metodología utilizada por el fabricante y la empleada en este trabajo (criterio 5).

Por otra parte la búsqueda de otros intervalos de referencia de inhibidor de C1 para transferir a este laboratorio (criterio 6), no permite solucionar el problema ya que no existen en bibliografía (7) (8) muchos ejemplos. La comparación de los valores obtenidos con los intervalos de referencia de bibliografía arroja más del 5% de los mismos por fuera de estos intervalos. Probablemente esto se deba a diferencias demográficas.

Dada la importancia de la detección de la deficiencia del inhibidor de C1 para el diagnóstico diferencial de angioedema surge la necesidad de establecer un intervalo de referencia propio (criterio 7). En este sentido sólo se han podido calcular rangos de referencia ya que únicamente se procesaron 57 muestras para el sexo femenino y 25 para el sexo masculino y no 120 como especifica la NCCLS (1) para el establecimiento de los mencionados intervalos.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Nilda Fink por su valioso aporte y destacada colaboración.

CORRESPONDENCIA:

MG. GRACIELA SUSANA ETCHEVERRY.
Calle 8 N° 1359 esquina 518 bis. (1901) RINGUELET
Provincia de Buenos Aires. Argentina
E-mail: gracielaetcheverry@hotmail.com

Referencias bibliográficas

1. National Committee of Clinical Laboratory Standards. How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory: approved guidelines. NCCLS document C-28. Villanova, PA; 1995.
2. Ventimiglia F, Fink NE. Intervalos de Referencia: metodología para su creación y verificación. Acta Bioquím Clín Latinoam 2002; 36: 223-33.
3. Uldall A. Garantía de Calidad en Química Clínica. La Plata: Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires; 1991.
4. Petitclerc C, Solberg HE. Approved Recommendation on the Theory of the Reference Values: Part 2. Selection of Individuals for the Production of Reference Values. J Clin Chem Clin Biochem 1987; 25: 639-44.
5. Reed AH, Richard JH, Mason WB. Influence of statistical method used on the resulting estimate of normal range. Clin Chem 1971; 17:275-84.
6. Wachtel M, Paulson C. Creation and verification of reference intervals. Lab Med 1995; 26:596.
7. Ordi-Ros J. Autoantibodies to C1 inhibitor in patients with lupus disease. J Rheumatol 1997; 24:9.
8. Jazwinska EC, Gatenby PA, Dunckley H, Serjeantson SW. C1 inhibitor functional deficiency in systemic lupus erythematosus (SLE). Clin Exp Immunol 1993; 92: 268-73.

Aprobado para su publicación el 19 de agosto de 2005