Experiencia de verificación de la estabilidad de enzimas en suero y plasma durante 60 y 120 minutos*

Octavio Calatayud-Ferre[1], María Lirios Juliá-Sanchis[2], Enrique Rodríguez-Borja[1], Rosario López-Giner[3], Edecia Ochoa-Ávila[4]

1. Doctor en Farmacia
2. Licenciada en Farmacia
3. Licenciada en Medicina
4. Doctora en Medicina.

* Hospital Lluis Alcanyis
Crta. Xàtiva-Silla. Km. 2
Xàtiva. (Valencia). España

Señor Director de
Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana
Dr. Juan Miguel Castagnino

De mi mayor consideración:
Le hago llegar la experiencia de verificación de la estabilidad de enzimas que realizamos en nuestro laboratorio a los efectos de su divulgación a través de Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana.
Sin otro particular, lo saluda cordialmente.

Dr. Octavio Calatayud-Ferre

Introducción

El empleo de anticoagulantes puede llevar a variaciones importantes en las determinaciones del laboratorio. Se conoce el efecto quelante del EDTA, el efecto contractor de las sales de oxalato así como el citrato sódico y las interferencias de la heparina (1-3). Sin embargo, las determinaciones de parámetros bioquímicos en plasma, obtenido en tubos con heparina, son muy frecuentes en los laboratorios clínicos.

Las determinaciones enzimáticas, aparte de los factores indicados que inducen al error analítico, tienen otros aspectos a considerar, ya que las enzimas también pueden verse afectadas por diversos inhibidores. Asimismo, las enzimas son sensibles a las variaciones de pH. Esto se debe a los efectos del mismo sobre la unión del sustrato, la actividad catalítica, la ionización del sustrato así como sobre la estructura proteica (4).

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana
Incorporada al Chemical Abstract Service.
Código bibliográfico: ABCLDL.
ISSN 0325-2957
ISSN 1851-6114 en línea

Los aumentos notables de temperatura y agentes como las radiaciones ultravioleta, rayos X y ultrasonido provocan inactivación enzimática. La elevación de la temperatura sin alcanzar la de termolabilidad de la enzima, se traduce en una aceleración de las reacciones enzimáticas. Asimismo, existen activadores enzimáticos iónicos tales como el cloruro para la amilasa o el magnesio para las fosfatasas (5).

El objetivo del presente estudio fue doble. Por una parte se pretendió establecer las posibles diferencias en la determinación de enzimas entre muestras séricas y plasmáticas. Por otra parte, dado que en la práctica cotidiana en ocasiones las muestras permanecen sin procesar durante periodos de tiempo relativamente largos a temperatura ambiente, por diversas circunstancias, se pretendió verificar que la estabilidad no se ve afectada por los diversos mecanismos de inestabilidad durante períodos de 60 y 120 minutos, tanto en las muestras séricas como en las plasmáticas.

Materiales y Métodos

Se analizaron en paralelo, 71 muestras de suero y de plasma, obtenidas en tubos BD Vacutainer de 3,5 mL sin anticoagulante para las muestras séricas y tubos BD Vacutainer de 4,5 mL con heparina de litio para las plasmáticas, ambos con gel separador.

Las muestras recibidas procedían de los Servicios de Urgencias, Unidad de Cuidados Intensivos y de las distintas plantas del Hospital Lluis Alcanyis de Xàtiva y fueron procesadas en las condiciones habituales. Se centrifugaron a 1500 g durante 10 minutos dentro de los 20 minutos tras su recepción, a temperatura ambiente, sin descapsular y sin protección especial de la luz. Ninguna de las muestras presentaba hemólisis, ictericia ni lipemia evidenciables.

Las enzimas estudiadas fueron las siguientes: aspartato aminotransferasa (AST, EC 2.6.1.1), alanina aminotransferasa (ALT, EC 2.6.1.2), fosfatasa alcalina (FA, EC 3.1.3.1), gamma glutamiltransferasa (GGT, EC 2.3.2.2), creatina quinasa (CK, EC 2.7.3.2), colinesterasa (CHS, EC 3.1.1.8) y amilasa (AMS, EC 3.2.1.1). Las unidades de las enzimas se expresaron como UI/L.

Tras la recepción y centrifugación de las muestras se efectuaron las determinaciones enzimáticas con las muestras de los tubos de suero y de plasma (análisis a tiempo 0). A continuación se dejaron en reposo a temperatura ambiente y se repitieron las determinaciones a los 60 y a los 120 minutos.

Las determinaciones se efectuaron en el autoanalizador Synchron LX 20 PRO (Beckman Coulter Inc, Fullerton, California, EE.UU.). Los métodos analíticos empleados se realizaron según las indicaciones del fabricante y fueron:

AST y ALT: método de Henry.
FA: AACC (método cinético con tampón AMP).
CHS: butiril tiocolina.
AMS: método enzimático DS.
GGT: método de Szasz.
CK: método de Rosalki.

La concordancia entre los valores de las enzimas estudiadas en ambos tipos de muestra, al igual que entre los resultados obtenidos a tiempo 0 y los obtenidos a los 60 y 120 min se calcularon mediante el Coeficiente de Correlación Intraclase (CCI) considerándose un buen grado de acuerdo a partir de 0,81.

La intercambiabilidad de los valores de las diferentes enzimas entre suero y plasma se analizó mediante las respectivas rectas de regresión, en las que se consideró como variable independiente el valor de las enzimas en muestras séricas, y como variable dependiente el de muestras plasmáticas, estimando la presencia de un error sistemático constante si la ordenada en el origen era diferente de 0 y proporcional si la pendiente era diferente de 1.

Todas las estimaciones fueron realizadas mediante el programa estadístico Stats Direct versión 2.4.4.

Resultados

Tal como se expresa en la Tabla I, los valores medios de las enzimas estudiadas fueron prácticamente iguales en los dos tipos de muestra, aunque ligeramente más altos en suero que en plasma, excepto la GGT; sin embargo, a pesar de estas ligeras diferencias, los valores de los CCI muestran un alto grado de concordancia entre los resultados obtenidos en suero y plasma, siendo todos superiores a 0,990, tal como se indica en la mencionada tabla.

En cuanto a la intercambiabilidad de los resultados, las rectas de regresión calculadas para las diversas enzimas en muestras séricas y plasmáticas, muestran que los resultados en ambas muestras son intercambiables, pues como se observa en la Tabla I, el intervalo de confianza del 95% de la ordenada en el origen contiene el valor 0, y para la pendiente contiene el valor 1, en todos los casos.

Cuando se relacionan los valores a tiempo 0 con los valores obtenidos a los 60 y 120 min respectivamente, de todas las enzimas estudiadas tanto en muestras séricas como plasmáticas, se aprecia una buena estabilidad a temperatura ambiente, tal como puede observarse en la Tabla II en las que los CCI indican un alto grado de concordancia.

Tabla I. *Valores medios (Vm), Desviaciones estándar (DE), Coeficientes de correlación intraclase (CCI), Rangos en suero y plasma y Pendiente (m), Ordenada en el origen (b) e Intervalo de confianza al 95% de la pendiente (IC 95% m) y de la ordenada en el origen (IC 95% b) de las rectas de regresión para las diversas enzimas entre las muestras séricas y plasmáticas.*

	Vm (DE) suero	Vm (DE) plasma	CCI	Rango suero	Rango plasma	Pendiente (m)	Ord. origen (b)	IC 95% m		IC 95% b	
FA	80,93 (52,28)	79,70 (57,87)	0,9991	18-460	18-457	0,9922	-0,6017	0,9834	1,0010	-1,4746	0,2710
ALT	46,72 (72,83)	46,01 (72,57)	0,9994	7-470	7-466	0,9959	-0,5122	0,9981	1,0036	-1,1844	0,1600
AST	72,28 (143,17)	71,93 (143,34)	0,9999	14-856	13-854	1,0011	-0,4343	0,9982	1,0041	-0,9089	0,0403
AMS	148,63 (258,67)	148,18 (258,34)	0,9999	12-1730	11-1725	0,9987	-0,2597	0,9969	1,0005	-0,7777	0,2583
CHS	7774,10(3208,60)	7661,24(3175,36)	0,9981	839-14345	830-14307	0,9984	-22,9579	0,9767	1,0001	-121,3474	75,4116
CK	245,15 (339,49)	242,31 (331,95)	0,9996	14-1594	17-1567	0,9950	-1,6231	0,9884	1,0016	-4,3341	1,0879
GGT	57,32 (76,21)	57,35 (75,69)	0,9994	8-354	9-367	0,9927	0,4478	0,9848	1,0005	-0,2972	1,1929

Tabla II. *Valor medio (Vm) y desviación estándar (DE) de los diferentes enzimas en suero y plasma a los tiempos 0, 60 y 120 minutos y coeficientes de correlación intraclase (CCI) entre los valores a tiempo 0 y los de 60 y 120 minutos.*

Parámetro	Vm (DE); t=0	Vm (DE); t=60	CCI 0-60	Vm (DE); t=120	CCI 0 - 120
FA (suero)	80,93 (58,28)	81,20 (58,47)	0,9997	81,18 (58,38)	0,9997
FA (plasma)	79,70 (57,87)	79,70 (57,79)	0,9997	79,70 (57,89)	0,9994
ALT (suero)	46,72 (72,83)	46,63 (72,78)	0,9998	46,80 (72,75)	0,9999
ALT (plasma)	46,01 (72,57)	45,20 (71,68)	0,9980	45,56 (72,65)	0,9991
AST (suero)	72,28 (143,17)	72,36 (143,23)	1,0000	72,74 (143,43)	0,9999
AST (plasma)	71,93 (143,34)	72,08 (143,41)	0,9997	72,55 (143,50)	0,9995
AMS (suero)	134,89 (246,04)	135,09 (246,13)	1,0000	135,11 (245,79)	1,0000
AMS (plasma)	134,45 (245,75)	134,14 (245,71)	1,0000	134,17 (245,64)	1,0000
CHS (suero)	7783,81(3230,72)	7805,27(3267,68)	0,9986	7790,97(3285,55)	0,9976
CHS (plasma)	7669,31(3197,55)	7678,07(3211,56)	0,9997	7641,74(3212,99)	0,9986
CK (suero)	245,15 (333,49)	244,66 (334,05)	0,9998	245,69 (333,22)	1,0000
CK (plasma)	242,31 (331,95)	242,29 (331,99)	1,0000	246,42 (336,03)	0,9930
GGT (suero)	57,32 (76,21)	57,22 (75,97)	0,9999	57,48 (76,66)	0,9998
GGT (plasma)	57,35 (75,69)	57,15 (75,49)	0,9999	57,17 (75,48)	0,9998

Discusión y Conclusiones

Diversos autores a lo largo de los años y todavía hoy continúan comparando los valores de diversos analitos obtenidos entre muestras séricas y plasmáticas, así como su estabilidad. Los resultados que se observan en la literatura son a veces controvertidos y, por ello, se decidió llevar a cabo este estudio.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran un discreto aumento en la mayor parte de las enzimas analizadas en muestras séricas respecto a las plasmáticas. Este hecho se pensó que podría deberse a la liberación de enzimas intracelulares o productos de las células sanguíneas que se producían durante el proceso de coagulación de la muestra, ya que el proceso de retracción del coágulo ocasionaría una liberación de sustancias (enzimas y otras) que modificaría los valores obtenidos (6). Con respecto a la CK, este aumento se atribuyó a la liberación de enzimas eritrocitarias, como la adenilato-quinasa, y productos intermediarios como ATP o glucosa-6-fosfato que pueden interferir en su determinación (7). Para la GGT no se observó aumento, si bien algunos autores encontraron valores superiores, aunque sin repercusión clínica en plasma, atribuibles a la turbidez provocada por la heparina en la reacción de Szasz (8). Otros, por el contrario, encontraron valores mayores en muestras séricas atribuibles al incremento en suero durante el proceso de coagulación (6).

Por otro lado, al estudiar la estabilidad de las enzimas a temperatura ambiente durante las dos primeras horas en muestras séricas y plasmáticas, se observó que es buena, ya que los valores medios en suero y plasma a los 60 y 120 min concuerdan perfectamente con los obtenidos en muestras basales. Este hecho coincide con lo publicado por diversos autores (9)(10).

De lo expuesto, se deduce que en este caso los resultados son intercambiables entre suero y plasma presentando, además, una alta concordancia. También se

piensa que los factores indicados anteriormente que pudieran alterar la estabilidad de las enzimas, no tienen ninguna relevancia durante las dos primeras horas de conservación a temperatura ambiente, ni en las muestras séricas ni en las plasmáticas.

CORRESPONDENCIA

DR. OCTAVIO CALATAYUD FERRE
Laboratorio de Bioquímica
Hospital Lluis Alcanyis
Crta. Xàtiva-Silla. Km 2
XÀTIVA (VALENCIA). España
E-mail: calatayud_oct@gva.es

Referencias bibliográficas

1. Richterich R. Klinische Chemie, 3a ed. Basilea: Karger Verlag; 1971.
2. Endres DB, Rude RK. Mineral and Bone Metabolism. In: Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. Fifth Edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2001. p. 795-821.
3. Sassolas A, Chellan D, Drai J, Bondon PG, Cartier R. Peut-on prélever le bilan lipidique sur héparine? Ann Biol Clin 2004; 62: 583-6.
4. Voet D, Voet JG. Rates of Enzymatic Reactions. In: Biochemistry. 3rd Edition. Hoboken: Wiley International Edition; 2004. p. 472-95.
5. Villar Palasí V, Cabezas Fdez Campo JA, Santos Ruiz A. Cinética y mecanismos de la reacción enzimática. En: Tratado de Bioquímica. 5ª Ed. Barcelona: Augusta S.A.; 1977. p. 683-710.
6. Ciuti R, Rinaldi G. Serum and plasma compared for use in 19 common chemical tests performed in the Hitachi 737 Analyzer. Clin Chem 1989; 35: 1562-3.
7. Hendersen AR, Moss DW. Enzymes. In: Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. Fifth Edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2001. p. 352-90.
8. Racine JF, Caya S, Delvin EE. Suitability of lithium heparinate plasma for the measurement of selected analytes on Beckman Synchron CX Analyzers. Clin Biochem 1996; 29: 493-5.
9. Heins M, Heil W, Withold W. Storage of serum or whole blood samples? Effects of time and temperature on 22 serum analytes. Eur J Clin Chem 1995; 33: 231-8.
10. Bayanton BL Jr, Blick KE. Stability studies of twenty-four analytes in human plasma and serum. Clin Chem 2002; 48: 2242-7.

Aceptado para su publicación el 15 de julio de 2008