

CALCULO DEL ERROR SISTEMATICO TOTAL EN LA DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA TRANSAMINASA GLUTAMICO PIRUVICA EN SUERO ☆

Rigoberto Blanco*, Mario Espinoza**, Gerarda Rodríguez***, Flor Sandí****

RESUMEN

Se presenta el cálculo del error sistemático (que define los límites aceptables de exactitud), para la determinación de la transaminasa glutámico pirúvica en suero por espectrofotometría, que es una de las mejores pruebas para realizar este cálculo. Se demuestra que el error sistemático total es muy alto desde el punto de vista analítico, sobre todo por la diferencia en absorbancias (39%). El total de las contribuciones al error en la actividad enzimática es del 28 por ciento. Este error no es importante en esta prueba para pacientes sanos, pero en casos en los que el ámbito de valores de referencia o "normales" sea más reducido, un error de esta magnitud puede ser crítico desde el punto de vista clínico. [Rev. Cost. Cienc. Méd. 1984: 5(2);139-143].

INTRODUCCION

Es muy común encontrar publicaciones científicas en las que se hacen cálculos, pero no se le presta la debida atención a la incidencia directa que el número y la calidad de las mediciones, que se realizan durante el desarrollo del método, tienen sobre el resultado final. Entre más incertidumbre tengan las mediciones, menor será la confianza en el resultado.

Las publicaciones en Química Clínica no escapan a esta falta de cuidado y en muchos laboratorios clínicos las determinaciones de las actividades enzimáticas, que tienen un gran valor diagnóstico desde el punto de vista analítico, entrañan una serie de mediciones que concurren generalmente en un gran error sistemático en el resultado.

En este trabajo se tomó como ejemplo la determinación de la actividad enzimática de la transaminasa (transferasa) glutámico pirúvica en suero por espectrofotometría (12), ya que este método, por el número de pasos y mediciones en la determinación, presenta una de las mejores perspectivas de análisis y cálculo del error sistemático. La expresión utilizada para calcular la actividad enzimática (U), la cual se deriva de la ley de Beer y bajo la suposición de que la reacción ocurre según una cinética de orden cero es (10):

$$U (u/L)^{-1} = \Delta A \times \frac{1}{a} \times \frac{V}{V_m} \times \frac{1}{t} \times e^{KT} \times 1000$$

☆ Trabajo presentado en el V Congreso de Ciencias Médicas, Provincia de Guanacaste y XIV Congreso Nacional de Hospitales.

* Investigaciones Toxicológicas, Organismo de Investigaciones Judiciales; Escuela de Química, Universidad de Costa Rica.

** Escuela de Química, Universidad de Costa Rica.

*** Centro de Salud, Puntarenas, Ministerio de Salud.

**** Clínica San Rafael, Puntarenas, Caja Costarricense de Seguro Social.

en donde ΔA es el cambio en la absorbancia, a es la trayectoria óptica, V_t es el volumen total, V_m es el volumen de la muestra, K es el coeficiente térmico de la enzima, T es la temperatura absoluta y t es el tiempo de reacción.

En toda determinación experimental se pueden esperar dos tipos de errores: los sistemáticos, que definen los límites aceptables de exactitud, y los casuales, que determinan la precisión. La determinación de los primeros se puede hacer realizando un estudio de propagación de error (13), bajo la suposición de que las variables químicas se han optimizado, las variables instrumentales son independientes unas de otras y las tolerancias siguen una distribución gaussiana con un límite máximo de dos desviaciones estándar (2). Esto permite utilizar la siguiente expresión para la desviación estándar relativa de la medición de la actividad enzimática para el caso que nos ocupa:

$$DS_r^2 U = DS_r^2 \Delta A + DS_r^2 \frac{1}{a} + DS_r^2 V_t + DS_r^2 \frac{1}{V_m} + DS_r^2 \frac{1}{t} + DS_r^2 KT$$

en donde cada uno de los términos S_i^2 es la varianza de la variable respectiva (1, 5, 6, 9). Esta expresión es útil porque permite identificar las fuentes de error sistemático y evaluar experimentalmente su contribución, teniendo así una medida cuantitativa propia del método.

Se identifican las siguientes fuentes de error sistemático en este método:

1. medición del volumen de muestra
2. medición de los volúmenes de reactivos
3. trayectoria o paso óptico
4. tiempo de reacción
5. cambio en la absorbancia
6. factores instrumentales que afectan las mediciones de absorbancia.
7. efecto de la temperatura en la actividad de la enzima.

Aunque se encuentran en la literatura cálculos del error sistemático total en sistemas automáticos de análisis (7, 8), la identificación de estas fuentes de error para las condiciones no automatizadas de trabajo clínico, no se ha hecho.

MATERIALES Y METODOS

Las determinaciones se realizaron en sueros frescos provenientes de pacientes clínicamente sanos escogidos al azar, en la unidad de laboratorio clínico del Centro de Salud de Puntarenas, Costa Rica con reactivos y patrones suministrados por el Laboratorio de Reactivos de la Caja Costarricense de Seguro Social.

Se usó el método de Reinman-Frenkel (12), haciendo las mediciones de absorbancia con un espectrofotómetro Coleman Junior III, modelo 618. Se usó material volumétrico usual y un baño termoestabilizado a $37,0 \pm 0,5$ °C.

La varianza en las mediciones de los volúmenes y los reactivos se obtuvo calibrando el material volumétrico según Willard *et al* (14).

La varianza en la trayectoria óptica se obtuvo utilizando disoluciones de concentración exacta de dicromato de potasio, medidas en las cubetas de uso cotidiano en el laboratorio según Reilley y Sawyer (11).

El tiempo de reacción se determinó haciendo varias corridas para alícuotas de un mismo suero, bajo las mismas condiciones experimentales.

Para estimar la linealidad en la cinética de la enzima, se hicieron determinaciones cada cinco minutos durante treinta minutos, por triplicado. Todas las mediciones se hicieron en un mismo día.

Las varianzas de los factores instrumentales se obtuvieron de la información suministrada por la casa fabricante del espectrofotómetro, y haciendo uso del tratamiento propuesto por Pardue *et al* (10) para estimar su efecto en la medición de la absorbancia o la transmitancia.

El efecto de la temperatura se determinó haciendo mediciones cada tres minutos, durante los treinta minutos de incubación, utilizando un termómetro de precisión ASTM de 25 a 50 °C. El coeficiente térmico se obtuvo de la literatura (3b).

RESULTADOS Y DISCUSION

En el Cuadro I se presentan las varianzas obtenidas para cada una de las variables experimentales, expresadas como porcentajes de error en el resultado del análisis. Las contribuciones de los factores instrumentales se presentan en el Cuadro II, junto con el error fotométrico de las absorbancias y las varianzas respectivas.

El estudio de propagación de error muestra que el error sistemático total de este método es muy alto desde el punto de vista analítico. La principal contribución proviene de la diferencia en absorbancias, que corresponde a un 39 por ciento. Esta contribución será cada vez menos importante al ir aumentando el valor absoluto de la diferencia, pero las contribuciones “fijas” provenientes de las otras variables experimentales y de las características del instrumento, se mantienen dentro de ámbitos de variación pequeños, lo que concuerda con lo reportado por Ingle y Crouch (4). Estas contribuciones corresponden a un 28 por ciento de error en la actividad enzimática.

Para la enzima utilizada, el porcentaje de error total encontrado no es de importancia clínica en pacientes sanos, ya que el ámbito de valores normales es bastante amplio, de 5 a 30 u/L (12). Sin embargo, es necesario considerar estos resultados cuando el ámbito de valores normales es pequeño, como por ejemplo con la fosfatasa ácida, o bien en circunstancias clínicas sintomáticas con valores ligeramente elevados, en las que un error de esta magnitud puede ser crítico en el diagnóstico. Los resultados obtenidos para los errores sistemáticos propios del instrumento, ilustran el cuidado que debe tenerse al utilizar métodos de análisis desarrollados para instrumentos de alta precisión, en instrumentos de menor sensibilidad. Este es un factor que muchas veces no se considera al elegir los métodos rutinarios de trabajo, pero debe ser tomado en consideración a la luz de la relación costo-beneficio.

El error casual es difícil de evaluar, pero considerando la cantidad de operaciones que conlleva el método, es obvio que las fuentes de error casual pueden ser importantes.

“Los resultados que se obtienen en una determinación química carecen de valor si no se conoce el grado de inexactitud que entrañan, razón por la que es muy importante conocer el grado de error de los métodos usados en Química Clínica” (3a).

ABSTRACT

The systematic error in the pyruvic glutamic transaminase was determined. This error defines the acceptable limits of exactitude. The spectrophotometric method was utilized. This transaminase determination is considered one of the best for determining the systematic error, because of the multiple steps in procedure and different volumetric measurements.

The total systemic error demonstrated was very high (28%) from an analytical point of view. The difference in absorbance accounts for the biggest error (39%). This total error is not important in this determination and for healthy subjects, because the normal range is ample. But in the case of other determinations, ie acid phosphatase, where the range is much smaller, this magnitude of error can be critical from a clinical point of view.

CUADRO I

EFFECTO DE CADA FUENTE DE ERROR SISTEMATICO EXPERIMENTAL EN LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA GTP

Variable	Varianza relativa X 10 ⁴	Efecto (% error en la actividad enzimática)
trayectoria óptica	18	4,3
temperatura	10	3,2
volumen de la muestra	6,3	2,5
volumen total	1,2	1,1
tiempo de reacción	0,03	0,05
TOTAL	35	11

CUADRO II

EFFECTO DE CADA VARIABLE INSTRUMENTAL EN EL ERROR SISTEMATICO DE LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA GTP

Fuente de error sistemático	Varianza relativa X 10 ⁴	Efecto (% error en la actividad enzimática)
error fotométrico	1520 ^a	39
exactitud	2,2	1,5
luz difusa	2,9 ^a	1,7
ancho de banda	4,0 ^a	2,0
longitud de onda	2,2 ^a	1,5
ruido	110 ^b	11
deriva óptica	0,002	0,05
TOTAL	1640	57

Error sistemático total en la determinación de la actividad enzimática: 68%

a: calculado según referencia (10)

b: calculado según catálogo del fabricante.

BIBLIOGRAFIA

1. Bauer, E.L., **Manual de Estadística para Químicos**. Ed. Alhambra, Madrid, 1974; 8.
2. Dean, R.B., Dixon, W.J., Simplified Statistics for Small Number of Observations. **Anal. Chem.** 1951; 23:636-638.
3. Henry, R.J., **Química Clínica: Bases y Principios**. Ed. Jims, Barcelona, 1969; (a) 141; (b) 619.
4. Ingle, J.D., Crouch, S.R., Signal-to-noise ratio theory of fixed-time spectrophotometric reaction rate measurements. **Anal. Chem.** 1973; 45:333-339.
5. Laitinen, H.A., **Chemical Analysis**. McGrawHill Book Co, New York, 1960; 544.
6. Liteneau, C., Rica, I., **Statistical Theory and Metodology of Trace Analysis**, Halsted Press, New York, 1980; 56, 131.
7. Maclin, E., Rohlfing, D., Ansour, M., Relationship between Variables in Instrument Performance and Results of Kinetic Enzyme Assay-A system View. **Clin. Chem.** 1973; 19:832-837.
8. Maclin, E., A system analysis of GEMSAEC precision used as a kinetic enzyme analyzer. **Clin. Chem.** 1971;17:707-711.
9. O'Haver, T.T., Analytical Considerations, IN: Winefordner, J.D., ed. **Trace Analysis**, Wiley Interscience, New York, 1976; 16.
10. Pardue, H.L., Hewitt, T.E., Milano, M.J., Photometric Errors in Equilibrium, and kinetics Analysis Based on Absortion Spectroscopy. **Clin. Chem.** 1974; 20:1028-1042.
11. Reilley, C.N., Sawyer, D.T., **Experiments for Instrumental Analysis Methods**, Krieger Press, New York, 1979; 118.
12. Schosinsky, K., Vinocour, E., Brilla, E., Gutiérrez, A. Sáenz, G., **Manual de Técnicas de Laboratorio**, Oficina de Publicaciones, Universidad de Costa Rica, San José, 5a ed., 1978; 91-95.
13. Spiridonov, V.P., Lopatkin, A.A., **Tratamiento matemático de datos físicoquímicos**. Ed. MIR, Moscú, 1973; capítulos 1-5.
14. Willard, H.H., Furman, N.H., Bricker, C.E., **Análisis Químico Cuantitativo**, Ed. Marín, México, 1963; 101-103.