

Modificación del kit LACT, Seppim-Elitech y su aplicación en filtrado libre de proteínas

Modification of the kit LACT, Seppim Elitech and its application in free filtering of proteins

Gema E. García Dafonte¹; **Lázaro Llanes**²; **Carmen Nortey**³; **Miguel Hernández González**⁴; **P. Bigot**⁵

¹ Master en Bioquímica Clínica. Investigador Agregado. IMD

² Médico Especialista en Medicina del Deporte. IMD

³ Médico Especialista en Laboratorio Clínico. Jefe del Laboratorio Clínico del IMD.

⁴ Licenciado en Bioquímica y Licenciado en Cultura Física. Jefe de la Brigada Nacional Antidopaje. IMD

⁵ Doctor en Ciencias. QA/R&D Manager Seppim. Zone Industrielle, Francia.

RESUMEN

La intención de este trabajo fue adecuar el diseño original del kit LACT ofertado por Seppim-Elitech (kit LACT Seppim-Elitech) para su aplicación en filtrado libre de proteínas (FLP) matriz empleada en nuestro medio. Procedimientos: Se estudió la factibilidad de la aplicación del kit LACT, Seppim-Elitech en su versión original en FLP, evaluando la influencia del ácido perclórico (AP) sobre el pH óptimo de la reacción y la sensibilidad del método para cuantificar muestras diluidas 1:6 con AP. Se realizaron las modificaciones pertinentes que dieron origen a la versión modificada del kit (kit LACT modificado) con sensibilidad suficiente para ser aplicado a FLP; se evaluó la calidad analítica del kit LACT modificado mediante: estudios del error aleatorio (imprecisión) y de exactitud. El valor diagnóstico se comprobó por la aplicación del método en una prueba de terreno realizada a 14 atletas del sexo masculino con edad promedio de 24 años, de la preselección nacional de Hockey. Se cuantificaron los niveles de lactato en FLP en dos etapas de entrenamiento: preparación física general (PFG) e inicio del período competitivo (IC) procesándose ambas etapas por kit LACT modificado.

Palabras Claves: estandarización de técnicas, determinación de lactato, prueba de terreno.

ABSTRACT

The objective of this study was to adapt the original design of kit LACT offered by Seppim Elitech (kit LACT Seppim-Elitech) for its application in Free Filtering of Proteins (FLP) womb employed in our means. Was studied the feasibility of application of kit LACT, Seppim Elitech in its original version in FLP, evaluating the influence of perchloric acid (AP) on the optimal pH of reaction and the sensibility of the method to quantify dilute signs 1:6 with AP. The pertinent modifications were realized and it gave origin to the modified version of kit (kit modified LACT) with enough sensibility to be applicable to FLP; was evaluated the analytical quality of modified kit LACT through: Studies of the aleatory (imprecision) and exactness error. The diagnostic value was checked with the application of the method during a field test realized to 14 masculine athletes with average age of 24 years, belonging

to National Preselection of Hockey. The levels of lactate in FLP were quantified in two stages of training: General physical preparation (PFG) and the beginning of competitive period (IC) being processed both stages by modified kit LACT.

Key words: Lactato- free filtering of proteins-quantification-diagnostic

INTRODUCCIÓN

La determinación del lactato, metabolito intermediario de la glicólisis ha sido ampliamente utilizado en el deporte para determinar el umbral anaerobio del deportista y evaluar el estado o el desarrollo de las diferentes cualidades motrices, de aquí su valor como herramienta útil para dosificar las cargas externas de entrenamiento y controlar el efecto de las mismas (1)

El ácido láctico es producido en las miofibrillas de los músculos esqueléticos cuando en ellas predominan las condiciones anaerobias, rápidamente se disocia, difunde y aparece en la sangre como lactato; el máximo de lactato que se puede generar representa el componente anaeróbico del acondicionamiento de un atleta, su incremento depende directamente de la intensidad del ejercicio (2).

El laboratorio clínico del Instituto de Medicina del Deporte (IMD) ha estado imposibilitado de ofrecer este servicio debido a que actualmente no se oferta el kit diagnóstico diseñado para filtrado libre de proteínas (FLP) por la Boehringer Mannheim y los restantes kits comerciales tienen formatos para su uso en suero; por razones prácticas, el uso de FLP es imprescindible en nuestro medio por colectarse solamente 20 mL de sangre capilar del pulpejo del dedo durante las pruebas de terreno o de laboratorio desarrolladas a la población de atletas asistida en el IMD y dependencias.

Por lo anterior nos propusimos adecuar el diseño original del kit LACT Seppim-Elitech para suero dando origen a la versión kit LACT modificado la cual fue estandarizada en el IMD siguiendo los análisis de calidad y procedimientos estadísticos establecidos (3).

Para la evaluación del valor diagnóstico del kit LACT modificado se utilizó como referencia los resultados tradicionalmente obtenidos en la preselección nacional de hockey sobre césped (hockey s/c) con edad deportiva de 8 años y 5 años de experiencia ejecutando la prueba denominada Test Integral en dos etapas de entrenamiento diferentes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Evaluación de la factibilidad del kit LACT Seppim-Elitech en FLP

Influencia del ácido perclórico (AP) sobre el pH óptimo de la reacción.

Se evaluó visualmente el cambio de coloración en tiras de pH colorphast pH 0-14 introducidas en dos frascos independientes que contenían:

1.0 mL de solución de trabajo (R1).

1.0 mL de R1 + 0.05 mL de AP 0.6N.

Obtención de muestras de suero y FLP para ser procesadas en paralelo por el kit LACT Seppim-Elitech.

Se colectaron 2 mL de sangre venosa provenientes de 6 atletas de Boxeo; 40 mL de sangre se mezclaron con 200 mL de AP 0.6N para la obtención del FLP. El resto de la sangre se dejó a temperatura ambiente por 1h para la extracción posterior del suero.

Se centrifugaron los tubos con sangre+AP a 12 000 rpm durante 2 minutos y los tubos con sangre total a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

Los sobrenadantes se trasvasaron a tubos eppendorf de 2.0 mL para ser procesadas por kit LACT Seppim-Elitech.

Procesamiento en paralelo de las muestras de suero y FLP (atletas de Boxeo).

Las muestras fueron procesadas por el kit LACT Seppim-Elitech (10 µL de muestra + 1 mL de R1), incubadas por 5 minutos a 37°C en tubos eppendorf de 2 mL, las lecturas de densidad óptica (DO) se realizaron en espectrofotómetro LKB, Pharmacia a $\lambda=540\text{nm}$.

Se incluyó una dilución 1:6 del estándar del kit con AP 0.6N (20 µL de estándar 4,44 mmol/L + 100 µL de AP 0.6N) simulando la dilución de la muestra de sangre en AP para la obtención del FLP.

Modificación kit LACT Seppim-Elitech para su aplicación en FLP

Se evaluaron diferentes volúmenes de R1 y 20 µL de muestra, utilizando el estándar 4.44 mmol/L y su dilución 1:6 con AP. Como referencia se utilizó kit LACT Seppim-Elitech.

20 uL estándar + 1mL de R1.

20 uL estándar + 0.5 mL de R1.

método de referencia (kit LACT Seppim-Elitech): 10 uL estándar + 1 mL de R1),.

Las condiciones de incubación y de lecturas fueron igual a las mencionadas anteriormente.

Error aleatorio (imprecisión) del kit LACT modificado

Variación intra e interensayos

Se procesó dentro de una misma corrida, 10 repeticiones del estándar 4.44 mmol/L diluido 1:6 en AP; el cálculo de la media (X), desviación estándar (DS) y coeficiente de variación en por ciento (CV%) se ejecutó utilizando el programa EXCEL.

La variación día a día del estándar 4.44 y su dilución 1:6 en AP se realizó en 15 corridas diferentes ejecutadas en trabajos de rutina del laboratorio clínico del IMD; los cálculos de $X \pm DS$ y CV% se ejecutaron aplicando el programa EXCEL.

Exactitud del kit LACT modificado

Efecto matriz del ácido perclórico

Se disolvió ácido láctico (Li salt) en 60g/L de solución de albúmina conteniendo 150 mM NaCl, esta solución se diluyó 1:5, 1:10 y 1:20; una parte de las muestras no se trató con AP 0.6N (ND) y la otra fue desproteïnizada por la adición de 100 µL de AP

0.6N a 20 μ L de muestra (D). Las muestras D (desproteïnizada) se dejaron a temperatura ambiente por 10 minutos y luego se centrifugaron a 5000 rpm por 15 minutos.

Se procesaron 10 repeticiones de cada una (D y ND) en un equipo COBAS MIRA utilizando el kit LACT Seppim-Elitech. Posteriormente se realizó un análisis de comparación entre las muestras D y ND para cada dilución mediante la prueba "t" para muestras pareadas con el procesador estadístico SPSS versión 10.0 para un nivel de significación del 95%.

Correlación de resultados del kit LACT modificado con métodos de referencia

Correlación con tiras de lactato BM-lactate, Roche leídas por lactímetro Accusport (método de referencia).

A 13 atletas de gimnástica se les extrajo sangre capilar durante el entrenamiento para evaluar la concentración de lactato por tiras de lactato BM-lactate, Roche; de esta misma extracción se mezclaron inmediatamente 20 μ L de sangre + 100 μ L de AP para la cuantificación de lactato por kit LACT modificado. Los resultados se procesaron por el programa Origin.

Correlación con kit LACT, Boehringer Mannheim (metodo de referencia). Se procesaron en paralelo 36 muestras de FLP por el kit LACT, Boehringer Mannheim y el kit LACT modificado; las muestras procesadas provenían de atletas de Hockey que realizaban un test de terreno garantizando valores de concentración de lactato en zonas bajas y altas de concentración. Los resultados se procesaron por el programa Origin y adicionalmente se aplicó la prueba "t" para varianzas desiguales ($p < 0.05$) utilizando el programa EXCEL.

Aplicación diagnóstica kit LACT modificado

La evaluación diagnóstica se realizó aplicando una prueba de terreno adecuada a las características del deporte (Test Integral), en dos momentos de su plan de entrenamiento: final de la preparación física general (FPG) e inicio del periodo competitivo (IC); participaron 14 atletas del sexo masculino de la preselección nacional de hockey sobre césped (hockey s/c) con una edad deportiva de 8 años, 5 años de experiencia ejecutando la prueba y edad promedio de 24 años \pm 4 (X \pm DS).

La primera toma se realizó en reposo, la segunda después de carreras progresivas de ida y vuelta recorriendo tramos de 20 metros cada vez; el ritmo de la carrera se mantuvo por estímulo sonoro que minuto a minuto aumentaba la intensidad de trabajo hasta el agotamiento (test de Leger). La tercera toma de sangre se realizó después de 15min de descanso activo antes de la prueba de 300 metros, la cuarta toma posterior a dicha prueba y la quinta se realizó a los 10min de recuperación. Además en cada uno de los momentos de las tomas de sangre se midió la frecuencia cardiaca. Se calculó la X \pm DS en cada etapa de la prueba y se comprobó el valor diagnóstico del resultado obtenido por el kit LACT modificado.

Cálculos de resultados

Se utilizaron indistintamente los paquetes estadísticas contenidos en el programa Window entre ellos: EXCEL para cálculos de CV% y prueba "t" para varianzas desiguales, SPSS para prueba "t" muestras pareadas, Origin para el cálculo de la recta de regresión lineal.

RESULTADOS

Factibilidad del kit LACT Seppim-Elitech

Visualmente se comprobó que el pH del frasco conteniendo R1 osciló entre 7- 8 y el pH del frasco conteniendo R1+AP cercano a 7.

La tabla I muestra los valores de DO obtenidos en FLP inferiores a 0.1 y la ausencia de correspondencia entre las concentraciones en mmol/L de los resultados en suero y FLP.

Tabla I. Resultados obtenidos por kit LACT Seppim-Elitech en muestras de suero y FLP.

Muestras	Resultados en suero (mmol/L)	Resultados en FLP	
		Conc. (mmol/L)	Abs. (l 540nm)
1	1.4	1	0.02
2	4.7	2.4	0.05
3	2.8	1.2	0.02
4	6.4	3.0	0.06
5	10.7	5.5	0.11
6	6.3	4	0.08
Est 4.44mmol/L)	Abs. (l 540 nm = 0.5)	-	0.53
Est 1:6	-	4.2	0.08

Modificación Kit LACT Seppim-Elitech para FLP

La tabla II refleja los resultados de DO para A y B con respecto a la C de referencia, seleccionándose como óptima la variante B (0.02 mL muestra + 0.5 mL R1) con valores de DO = 0.37, cinco veces superior a la C de referencia.

Tabla II. Valores de absorbancia para las variantes estudiadas en muestras de FLP

Muestra	A	B	C
Est (4.44mmol/L)	1.0	2.0	0.51
Est 1:6	0.184	0.37	0.07

Precisión del kit LACT modificado (variante B)

Se presentan los CV% de la variación intra e interensayo del estándar 4.44 mmol/L y su dilución 1:6 (tabla III). Los CV% se encuentran por debajo del 3% en todos los casos.

Tabla III. Precisión del kit LACT modificado (variante B)

	Intraensayo (DO l= 540 nm)	Interensayo (DO l= 540 nm)	
	Est 1: 6 (n=10)	Est (n=15)	Est 1: 6 (n=15)
X +/- DS	0.34 +/- 0.01	1.98 +/- 0.04	0.34 +/- 0.01
CV %	2.7	2	2.9

Estudio del efecto matriz del ácido perclórico

La tabla IV demuestra que las X para los grupos D y ND en las diluciones 1:5, 1:10 y 1:20 son similares, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los grupos D y ND para cada dilución al aplicarse el test "t" para muestras pareadas en un nivel de significación del 95%.

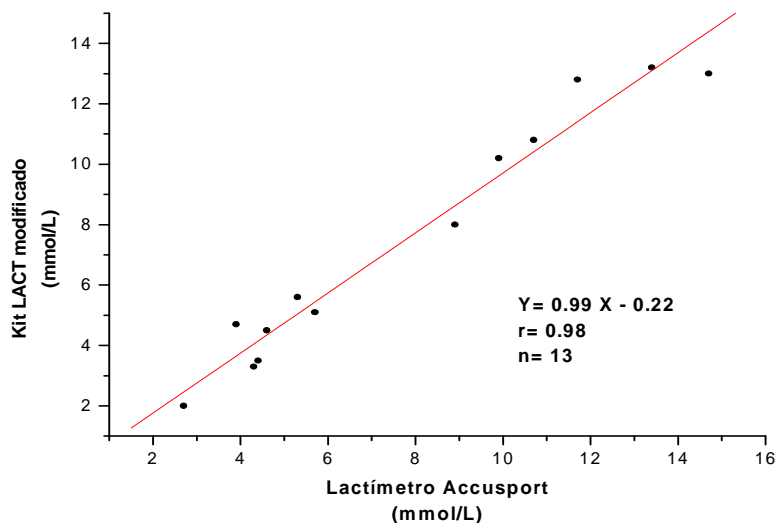
Tabla IV. Estudio del efecto matriz del ácido perclórico 0.6N.

	Dilución 1:20		Dilución 1:10		Dilución 1:5	
	ND	D	ND	D	ND	D
	0.09	0.12	0.17	0.18	0.33	0.36
	0.09	0.12	0.17	0.18	0.35	0.36
	0.09	0.12	0.17	0.24	0.34	0.36
	0.1	0.12	0.17	0.18	0.34	0.36
	0.09	0.12	0.16	0.18	0.33	0.36
	0.09	0.12	0.17	0.18	0.34	0.36
	0.09	0.12	0.18	0.18	0.34	0.36
	0.09	0.12	0.17	0.18	0.35	0.36
	0.09	0.12	0.17	0.18	0.34	0.36
	0.09	0.12	0.17	0.18	0.34	0.36
X	0.091	0.12	0.17	0.186	0.34	0.36
DS	0.003	0.000	0.005	0.019	0.007	0.000

Correlación con métodos comerciales de referencias

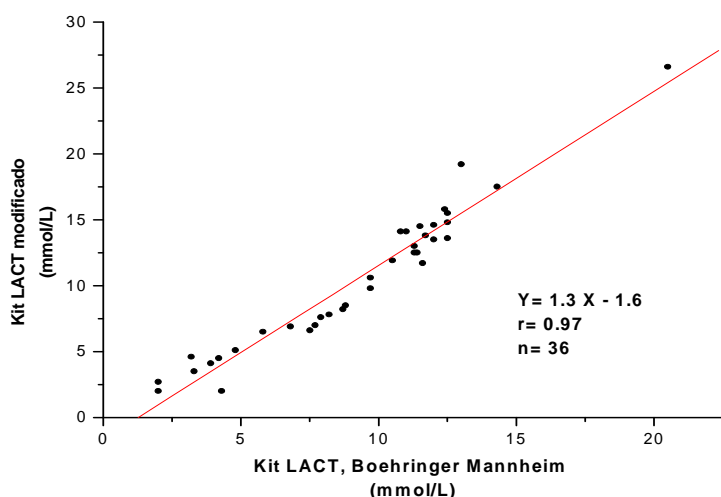
Los resultados de la comparación de las concentraciones obtenidas al procesar 13 muestras por tiras de lactato BM-lactate (eje X) y kit LACT modificado (eje Y) utilizando el programa estadístico Origin se muestran en la figura 1. Se obtuvo una recta de regresión con pendiente (m) de $m=0.99$, intercepto (I) de $I=-0.22$ para un coeficiente de correlación (r) de $r=0.98$ en un rango de trabajo de 2 a 15 mmol/L.

Figura 1. Correlación lactímetro y kit LACT modificado.



Los resultados de la comparación de las concentraciones obtenidas al procesar 36 muestras de FLP por kit LACT, Boehringer Mannheim (eje X) y kit LACT modificado (eje Y) utilizando el programa estadístico Origin se muestran en la figura 2. Se obtuvo una recta de regresión con $m=1.3$, $I=-1.6$ para una $r=0.97$. La aplicación del test "t" ($p < 0.05$) para varianzas desiguales utilizando el programa EXCEL demostró que no existen diferencias significativas entre los valores de concentraciones evaluados que cubrieron un rango de concentraciones desde 2.0 hasta 20.5 mmol/L.

Figura 2. Correlación kit Boehringer Mannheim y kit LACT modificado.



Aplicación diagnóstica del kit LACT modificado

Los resultados de la aplicación diagnóstica se muestran en tabla V, se aprecia que la media en mmol/L de lactato en etapas de reposo para FPG e IC son de 2.4 mmol/L con frecuencia cardiaca inferior a 62; la 3ra toma se corresponden con medias inferiores a 4.6 mmol/L para FC inferior a 129. Hubo diferencias significativas al comparar los resultados de reposo con los posteriores a actividad física, los últimos fueron superiores a 10 mmol/L para FPG e IC en la 2da y 4ta toma con FC superiores a 183. Por último se observa que la media en mmol/L de lactato decrecen por debajo de 7.5 mmol/L (5ta toma) a los 10 min de recuperación con FC inferiores a 120. Los resultados de FC no se muestran en la tabla fueron los referidos por el médico del deporte.

Tabla V: Resultados de la prueba de terreno en atletas de Hockey s/c.

	Valores de Concentración de Lactato en mmol/L									
	Reposo		2da Toma		3ra Toma		4ta Toma		5ta Toma	
	FPG	IC	FPG	IC	FPG	IC	FPG	IC	FPG	IC
MEDIA	2.41	2.43	12.13	10.13	4.64	4.23	14.40	13.55	7.59	6.77
DS	0.55	0.45	2.50	3.25	1.52	1.67	1.92	3.13	1.26	1.09
MÍNIMO	1.70	1.80	7.42	5.14	2.34	1.92	11.30	7.08	5.30	5.30
MÁXIMO	3.20	3.40	15.90	15.50	6.72	7.78	17.60	19.2	10.00	9.00

DISCUSIÓN

El estudio sobre la factibilidad del kit LACT Seppim-Elitech en su versión original tuvo el objetivo de comprobar su posible aplicación en FLP, el mismo consistió en evaluar los cambios de pH ocasionados por la presencia del AP en la reacción y evaluar la sensibilidad del método para FLP donde las muestras se diluyen 1:6 por la adición del AP.

Los resultados demuestran que el pH se mantuvo neutro aún en presencia del AP 0.6N lo que permitió trabajar con la solución de trabajo (R1) ofertada por el fabricante; sin embargo los valores de DO obtenidos para el FLP (tabla I) fueron inferiores a 0.1 lo que implicaba trabajar en una zona poco precisa del espectrofotómetro incrementando el error aleatorio (imprecisión) del método.

Por lo anterior se procedió a evaluar proporciones de R1 y muestra que permitieran trabajar en un rango de DO reproducible seleccionándose por razones prácticas la variante B (tabla II). Empíricamente se consideró que esta combinación de reactivos (0.02 mL muestra + 0.5 mL R1) era adecuada y fue la utilizada en los estudios de imprecisión, correlación con métodos de referencia y en la prueba de terreno ejecutada en hockeyistas.

Consideramos importante aclarar que el cálculo de la concentración en la versión modificada (kit LACT modificado) se realizó introduciendo en la programación del espectrofotómetro el valor de concentración de 4.44 mmol/L para la dilución 1:6 aún cuando lo real correspondía a 0.74, evitando de esta forma el engorroso trabajo de la multiplicación final por seis, no viable para la rutina del laboratorio clínico, de esta forma el resultado final se obtiene automáticamente multiplicado expresado en mmol/L.

Los resultados del error aleatorio del kit LACT modificado (tabla III) corroboró lo acertado de la selección de la variante B con CV% inferiores al 3% para las variaciones intra e interensayos que se corresponden con lo aceptado en la rutina de trabajo del laboratorio clínico procesada de forma manual (4,5). Adicionalmente la variante B posibilita que el kit diseñado para 100 determinaciones/kit pueda procesar el doble de las determinaciones a un costo de 0.25 USD/determinación.

El análisis estadístico realizado utilizando el procesador SPSS demostró que no existen diferencias significativas entre las poblaciones D y ND a los tres niveles de concentración ensayados lo que habla a favor de la no interferencia del AP en los valores de concentración de lactato obtenidos lo que posibilita su uso en FLP (6).

Los resultados de la correlación con métodos de referencia (fig. 1 y 2) empleando tiras de lactato ($r=0.98$) y el kit LACT de la Boehringer Mannheim ($r=0.97$), este último diseñado para FLP y ampliamente utilizado en el IMD, demuestran de manera fehaciente que la calidad analítica del kit LACT modificado es comparable a lo publicado internacionalmente (7) y habla a favor de su uso avalado por los resultados obtenidos con el kit LACT modificado comparables a los de la Boehringer Mannheim; no se encontraron diferencias significativas en un rango de concentraciones entre 2 y 20.5 mmol/L al aplicar el test "t" para varianzas desiguales procesado por EXCEL.

Por comunicación personal con el médico del equipo de Hockey con 5 años de experiencia realizando este tipo de prueba a la misma población participante en este estudio se corroboró, que los resultados obtenidos con el kit LACT modificado son comparables con lo tradicionalmente encontrado en el Test Integral (8); la interpretación diagnóstica desde el punto de vista metodológico y bioquímico serán

publicados posteriormente por los médicos y entrenadores correspondientes, haciendo un análisis exhaustivo de cada etapa de la prueba evaluada en PFG e IC, tomando en consideración las características individuales de los atletas.

Brevemente comentamos que los valores medios de reposo inicial (tabla V) son acordes con lo publicado por otros autores que reportan valores inferiores a 3 mmol/L. Los criterios aceptados para lograr el agotamiento en el test de Leger (2da toma) se corresponde con cifras de lactato superiores a 8mmol/L (9) y los obtenidos en este trabajo fueron de 12.1 y 10.1 mmol/L para FPG e IC respectivamente donde la potencia aeróbica máxima juega un papel determinante en el aporte energético.

También se encontraron cifras de lactato de 4.6 y 4.2 mmol/L después del aclaramiento láctico durante el descanso activo para la recuperación (3ra toma); la concentración de lactato se incrementa hasta 14.4 y 13.5 en la 4ta toma (prueba de 300 metros) por el incremento de la actividad física, predominando las condiciones anaerobias y donde la obtención de energía es básicamente a partir de la vía anaerobia láctica.

Concluimos que los resultados de la validación analítica y diagnóstica del kit LACT modificado habla a favor de la factibilidad de su uso en el laboratorio clínico del IMD y dependencias.

Agradecimientos

A la Dra. Graciela Nicot por las sugerencias metodológicas realizadas. A los técnicos Yaneisy Pérez y Berta Hernández por el trabajo de calidad desempeñado y a Seppim-Elitech por el apoyo brindado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Billat, LV: "Use of blood lactate measurements for prediction of exercise performance and for control of training. Recommendations for long-distance running" Sports Med 22:157, 1996.
- 2- Jacobs, I: " Blood lactate: implications for training and sports performance" Sports Med 2:139, 1986.
- 3- Dybkaer, R; McQuenn, M.J; Rej, R: "Introducción Mejoría Continua de la Calidad. Guía para los Laboratorios Clínicos de América Latina". Editorial Médica Panamericana, 1995.
- 4- Whitehead, TP: "Quality Control in Clinical Chemistry" Editorial Wiley Medical Publication, Londres, 1977
- 5- Martínez, H; Santana, S: "Manual de Procedimientos Bioestadísticos. Editorial de Ciencias Médicas, La Habana, 1990.
- 6- Bigot, P: "Lactate. Evaluation of the effect of the deproteinization". Reporte No. Lact290601. R&D Seppim, 2001.
- 7- Davison, RCR; et al : " Assessment of blood lactate: practical evaluation of the Biosen 5030 lactate analyzer". Med Sci Sports Exerc 32:243, 2000.
- 8- Llanes, L: Comunicación personal, La Habana, 2002.

9- Zouhal, H; Moussa, E; Foricher, J.M; Gratas-Delamarche, A; Delamarche, P:
"Change of lactatemia during sprint session in national level sprinters" Science and
Sports 17: 31, 2002.