

EVALUACIÓN DE GLUCEMIA POR EL MÉTODO DE O-TOLUIDINA

Evaluation of glycemia by the o-toluidine method

Dra. Gricel Rosquete López^I; Dra. Elsie González Vida^{II}; Dr. Delfín Londres Frómeta^{III}; Dr. Venerando Manzano Arroyo^{IV}

- I. Especialista en I Grado de Laboratorio Clínico. Profesor Asistente. Instituto Superior de Ciencias Médicas "Carlos J Finlay". Camagüey*
 - II. Especialista en I Grado de Bioquímica Clínica.*
 - III. Especialista en I Grado de Cirugía General. Profesor Instructor*
 - IV. Especialista en I Grado de Laboratorio Clínico. Profesor Instructor*
-

RESUMEN

Se realizó un estudio descriptivo de evaluación de la exactitud de la glucemia por el método de la o-toluidina, el cual se comparó con el método enzimático, utilizando la enzima glucosa oxidasa, desde agosto a septiembre de 2006 en el Hospital Amalia Simoni en Camagüey, con el objetivo de utilizarlo como un método alternativo al faltar el suministro de reactivos enzimáticos. Se realizó curva de calibración con la solución de referencia que se encuentra estandarizada en 100mg % (5.5mmol/l) con la finalidad de plotear los resultados obtenidos en ambos métodos y trazar la pendiente de 45° (curva de regresión lineal). Se procesaron 20 muestras de suero sanguíneo libres de hemólisis y de ictericia, de pacientes a los que se realizó el ensayo de glucosa por ambos métodos. Se partió de la hipótesis nula de que si existía o no relación entre ambas mediciones de glucosa obtenidos por ambos métodos, para lo cual se utilizó el coeficiente de correlación por rangos (r), el estadígrafo permitió evaluar la existencia de una medida de relación entre dos variables cuantitativas, de ahí se llegó a la conclusión de que al calcular la fórmula de correlación de Spearman (el valor fue muy cercano a uno), se dio respuesta a la hipótesis nula de que en ambas formas de medición los valores obtenidos en los métodos de determinación de glucosa empleados, se encuentran en relación, por tanto el método de condensación de la o-toluidina, método sencillo desde el punto de vista de su procesamiento o ensayo técnico-analítico, con reactivos asequibles y de producción nacional, puede realizarse y en efecto se tienen implantado en nuestro servicio asistencial, como un método alternativo, confiable y específico, que reúne los parámetros requeridos para brindar un servicio de calidad a nuestros pacientes y a nuestra comunidad en general.

DeCS: glucosa de sangre/análisis; prueba de tolerancia/métodos

ABSTRACT

A descriptive study of evaluation of the accuracy of the glycemia by the o-toluidine method was carried out, which was compared with the enzymatic method, utilizing the oxidase glucose enzyme, from August to September 2006, at "Amalia Simoni" Hospital of Camagüey, with the objective of utilizing it as an alternative method when lacking the supply of enzymatic reagents. Curve of calibration with the solution of reference that is standardized in 100mg% (5.5mmol/l), was performed with the purpose to study at random the obtained results in both methods and to draw the 45° slope (regression lineal curve). Twenty samples of blood serum free of hemolysis and jaundice were processed, of patients to a glucose trial using both methods was performed. It was started from the null hypothesis that if existed or not relation among both measurements of the obtained glucose in both methods, for which the correlation coefficient by ranks was utilized (r), the estadigraph permitted to evaluate the existence of a measure of relation between two quantitative variables, as a conclusion of that when calculating the Spearman's correlation formula (the value was very near to one), it was given an answer to the null hypothesis that in both forms of measurement the obtained values in the employed glucose decision methods, are in relation, therefore the condensation method of the o-toluidine, simple method since the point of view of its processing or technical-analytic trial, with accessible reagents and of national production, can be carried out and in fact it is established in our assistance service, as a specific, dependable, and alternative method, that gathers the required parameters to offer a quality service to our patients and to our community in general

DeCS: blood glucose; glucose tolerance test/methods

INTRODUCCIÓN

La determinación de los niveles de glucosa en plasma o suero sanguíneo y en líquidos corporales (orina, líquido cefalorraquídeo, ascítico, pleural, etc.) constituye una medición de primera línea para explorar las alteraciones del metabolismo hidrocarbonado, enfermedades muy frecuentes en nuestro país y en el mundo. Para la medición de la glucosa se reportan tres tipos de métodos, los métodos de oxidación-reducción, los de condensación y los enzimáticos. Los primeros aprovechan las propiedades de la forma enedial de la glucosa, la cual al ser muy reactiva se oxida fácilmente. En soluciones alcalinas calientes el cobre cúprico oxida la glucosa y se forma el ión cuproso, el cual es proporcional a la glucosa presente inicialmente. Estos métodos están en desuso actualmente por su falta de especificidad y lo trabajoso del ensayo.

Los métodos de condensación son aquellos en los cuales la glucosa puede quelarse a diversos compuestos aromáticos en solución ácida, dando lugar a productos coloreados que pueden medirse fotolorimétricamente. Entre estos compuestos aromáticos se hallan los fenoles y algunas aminas, entre ellas la ortotoluidina (o-toluidina). Según el fundamento, la glucosa al reaccionar con esta amina, en solución caliente, forma glucosalina. Los métodos enzimáticos, catalizan la oxidación de la *bd* glucosa por el oxígeno, formando ácido glucónico y H_2O_2 (peróxido de hidrógeno). Se utilizan diversas enzimas, entre ellas se ha ensayan la glucosa oxidasa y la hexoquinasa.¹⁻³

Existe una gran demanda en la realización de la determinación de glucosa en los últimos años en nuestro país, esto se determina por la deficiencia de reactivos químicos producidos por las empresas cubanas. El método que se brinda a las unidades asistenciales es el enzimático, proceder muy rápido y de gran confiabilidad, posee la limitación de que su costo no es barato, se encarece debido a que la obtención y purificación de las enzimas es un procedimiento que no se realiza siempre en el país (materia prima importada, que es procesada posteriormente en Cuba). Se

debe destacar que la determinación de glucosa, es el examen que más se realiza en los departamentos de química básica de los laboratorios clínicos y constituye el examen más solicitado en los servicios de urgencias del país.⁴ De ahí se decide escoger el método de condensación o-toluidina, para la determinación de glucosa en nuestra unidad asistencial, método muy confiable, específico para aldohexosas y sobre todo, con gran disponibilidad de reactivos químicos ya que la o-toluidina es la amina aromática y el ácido acético glacial y se encuentran asequibles en nuestros almacenes. En el presente trabajo nos proponemos evaluar el comportamiento de la exactitud de este método, en comparación con el método enzimático de la glucosa oxidasa, método de elección en la actualidad, pero con dificultades en la disponibilidad de reactivos.⁵⁻⁶

Teniendo en cuenta que la determinación de los niveles séricos o plasmáticos de este metabolito en sangre, constituye un pilar para la conducta a seguir ante prácticamente el 80 % de los pacientes que se atienden en las unidades asistenciales de salud, y que los programas de atención integral al adulto mayor y el materno infantil son muy importantes dentro de la política de salud del país y dentro de ellos, la determinación de glucemia constituye un eslabón indispensable para el seguimiento y diagnóstico de múltiples enfermedades, se considera necesario evaluar la exactitud del método de determinación de glucosa de la o-toluidina, en comparación con el método enzimático de la glucosa oxidasa como objetivo de este trabajo.

Federico Engels⁷ en su carta a Borgius plantea “las necesidades de la técnica hacen avanzar las ciencias mucho más que diez universidades, donde se elabore y se enseñe en lo fundamental el conocimiento teórico”, de ahí la necesidad de realizar la glucemia lleva a implantar este método.

MÉTODO

La exactitud de un método es el grado de identidad de los valores analíticos obtenidos con ciertos métodos y el contenido real del parámetro en cuestión en la muestra.⁸ Las

pruebas que se realizan para explorar la exactitud se basan en la medición de un material de referencia de una sustancia que posee un valor conocido, el cual se determinó con anterioridad en un centro de referencia. De ahí se utilizó la solución de referencia de glucosa de 100mg % (5.5mmol/l) para realizar la curva de calibramiento de la glucosa, basada en sobrecargas de dicha solución, logrando cuatro puntos de diferentes concentraciones crecientes (de menor a mayor concentración).⁹ En nuestro trabajo se utilizan también las muestras de suero sanguíneo de 20 pacientes a los que se les realizó la determinación de glucosa por ambos métodos (enzimático y o-toluidina), las cuales fueron procesadas en el departamento de química básica del hospital provincial "Amalia Simoni". Los sueros reunieron el requisito de que debían estar libres de ictericia y de hemólisis.

Los 24 puntos establecidos (20 muestras y cuatro patrones) fueron leídos en un instrumento fotocolorímetro chino, se utilizó una longitud de onda de 530nm. Todos se procesaron por duplicado, para garantizar la confiabilidad de los resultados, se realizó control de la calidad. Existió interés en conocer si los resultados que se obtienen para medir la glucosa a través de un método, se relacionan con los que se obtienen mediante otro método, de ahí se utilizó un parámetro estadístico que asocia dos variables cuantitativas, el coeficiente de correlación por rangos, mediante la fórmula de Spearman.¹⁰

$$r = 1 - 6d_i / n(n-1).$$

Si el valor del coeficiente de correlación de Spearman es cercano a uno, significa que ambos métodos de medición tienen relación.

En bioquímica clínica se acepta la existencia de una buena exactitud cuando en el ploteo de datos encontrados al realizar la curva de calibramiento, se puede trazar o se obtiene una recta pendiente de 45°. ¹¹ Por lo que se plantea la hipótesis nula (ho) si existe relación o no entre las determinaciones de glucosa entre ambos métodos.

El procedimiento técnico se utilizó en el método de determinación enzimático la reacción de la enzima glucosa oxidasa, donde va a ocurrir la oxidación de la glucosa a ácido glucónico (variante trinder ofertado por la empresa farmacéutica nacional). El

reactivo de trabajo fue el rapi-gluco-test. El método de condensación se conformó por el reactivo de trabajo que contenía tiourea y la amina aromática (ortotoluidina) en medio acidificado con ácido acético glacial. La o-toluidina está formada químicamente por tolueno y un derivado del petróleo, que es la anilina.¹²

Nuestra investigación tiene como objetivo evaluar el comportamiento de la exactitud del método de la o-toluidina en comparación con el método de la glucosa oxidasa por las dificultades en la disponibilidad de los reactivos enzimáticos y la necesidad de servir a las demandas de la población.

RESULTADOS

Según la curva de calibramiento de la glucosa por ambos métodos, (el de condensación para aldohexosas y el enzimático de la glucosa oxidasa), se utilizó el patrón de 5.5mmol/l, los cuatro puntos tuvieron concentraciones con orden creciente 3.5mmol/l, 11mmol/l, 16.5mmol/l y 22mmol/l. Se procedió a trazar la curva de calibramiento en papel milimetrado, donde se realizó el ploteo de los datos obtenidos en ambos métodos de determinación. En el eje de las abscisas se situaron las absorbancias o densidades ópticas y en el eje de las coordenadas se situaron las concentraciones. Se procedió a sustituir la fórmula del estadígrafo utilizado, que fue el coeficiente de correlación por rangos. El procedimiento que se utilizó para la obtención de los resultados fue la sustitución de los valores originales por la posición (el rango) que ocupan dentro de cada serie de datos. Se hicieron cinco series de datos de cinco elementos, cuatro de ellas y la última con cuatro componentes, hasta completar los 24 puntos de análisis. El coeficiente de correlación por rangos nos sirvió para aceptar la hipótesis de que existe relación entre ambos métodos de determinación de glucosa, ya que resultó ser muy cercano a uno (0.993) (Tabla 1).

Tabla 2. Resultados de la curva de calibramiento realizada con la solución de referencia de glucosa

Concentración (mmol/l)	Método enzimático	Método o-toluidina
5.5	0.18	0.185
11	0.36	0.35
16.5	0.54	0.55
22	0.72	0.73

Fuente: Encuesta

DISCUSIÓN

El método de condensación se utilizó empleando una amina aromática en medio ácido como la o-toluidina, se demostró como el más específico y más exacto de los métodos no enzimáticos conocidos para la medición de glucosa.¹³⁻¹⁵

Según la literatura revisada, este método sólo tiene dos inconvenientes, en primer lugar en la población pediátrica no debe utilizarse este método de determinación de glucemia, ya que sobre todo en los neonatos existe gran frecuencia de padecer de ictericia, de ahí que los niveles séricos de bilirrubina pueden encontrarse altos. La bilirrubina actúa como un artefacto que interfiere en la especificidad del método.¹⁶ El método no diferencia la galactosa de la glucosa, por eso en neonatos y niños con una alimentación predominantemente láctea, no se debe instaurar el método, en segundo lugar otra de las limitaciones la constituye la tonicidad de la amina aromática o-toluidina, ya que al someterla a ebullición a la hora del análisis o ensayo de laboratorio, en efecto puede desprender vapores tóxicos. Sin embargo, esta limitación puede hacerse despreciable si se utiliza una caperuza con protección nasal, se trabaja en un

ambiente ventilado o se utiliza una campana.¹⁷ Estos inconvenientes no se consideran relevantes, teniendo en cuenta la confiabilidad, especificidad y rapidez del método.

La curva de calibramiento de la glucosa es un proceder que debe practicarse cada vez que se ensaye el análisis de este parámetro (glucosa). Resulta muy asequible para el analista realizarla (en nuestro servicio se realiza siempre) por su sencillez técnica y aporta una gran confiabilidad en el trabajo diario. En este caso la curva de calibramiento en ambos métodos arrojó resultados muy similares, lo que demostró la reproducibilidad de los mismos. En esta vertiente se plantea que la o-toluidina es específica para aldohexosas, sobre todo la glucosa, lo cual coincide con lo revisado en la literatura.¹⁸ El desarrollo del color del reactivo ante los incrementos de concentración según las leyes de la fotolorimetría (Lambert y Beer) se demuestran en este sentido.

En la bioquímica clínica para validar un método, no sólo se ensaya el análisis con las soluciones de referencia como se hizo anteriormente, sino que es necesario evaluar el comportamiento de las muestras, o sea, la respuesta del ensayo y los reactivos ante el material biológico proveniente de cada paciente. De ahí se comparan ambos métodos con la misma corrida de un día de trabajo en el departamento de química clínica. Los resultados obtenidos dependieron no sólo de los aportes de las referencias revisadas, sino de comprobar la hipótesis planteada en las condiciones que se presentó, con el equipo de lectura utilizado (fotolorímetro chino), la longitud de onda seleccionada (530nm) y la dosificación o proporción establecida para el procedimiento técnico analítico del ensayo según el método empleado.¹⁹

Precisamente uno de los doce programas priorizados, que el Ministerio de Salud Pública delimita es el de medios diagnósticos, dada la repercusión que posee el desarrollo y la creación de nuevas perspectivas de proyección tanto en lo inmediato, como en el futuro tecnológico de nuestro sistema.²⁰ Por tanto, como conclusión y como proyección de las perspectivas actuales, se infiere lo importante y beneficioso para el desempeño exitoso de nuestro trabajo, la asistencia médica y nuestra profesión, evaluar la implementación de nuevos métodos que no porque no se utilicen, se encuentran desechados, como el método de la o-toluidina.

En la actualidad, se tiene la posibilidad con el montaje de este método, de no dejar de prestar servicios de asistencia médica a los pacientes, cuando por alguna circunstancia, falta el suministro o la disponibilidad de reactivo de glucosa por el método enzimático. Se necesitan agotar todas las alternativas para mantener nuestras conquistas.

No se debe dejar de mencionar el momento en que se vive, se deben resolver la problemáticas que se presentan con opciones propias y tangibles.

CONCLUSIONES

Se demostró que el método empleado tiene tanta exactitud como el método rapi–gluco-test, que normalmente se utiliza en los laboratorios clínicos y sirve como una alternativa ante el déficit de reactivos enzimáticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fon KH; Miller K, Henry A, Steven AM, Allen B, Illivian C, et al. Updates about several methods use in diabetics for determination of glucose and paraprotein. Emb journal 2004; 12: 725-8.
2. Capbell AM. Enzymatic assay using specific antibodies for determination of haemoglobin glycosilated in diabetic patient. 2004; vol 24 (supl 3): 20–5.
3. Harlow E, Lare E. Laboratory test for exploration of metabolism disorder. J. Biol. Chem 2003; 100: 525–50.
4. Cordié L, Vergés H. Diagnóstico del coma hiperosmolar causado por hiperglucemia en pacientes sin antecedentes de diabetes. Rev. Cub. Med 2004; 20: 101-5.

5. Abbis M. Development of color in condensation and photolorimetric assay using oxidase glucose. *Biochem and biophysic, acta* 2004; 1197: 14–44.
6. Ferguson NT. The method of o-toluidin in the diagnosis. *J. Biol. Chem.* 2004; 98: 100–2.
7. Colectivo de autores. *Lecturas de filosofía, salud y sociedad.* Ciudad de la Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2005.p.65–7.
8. Sonrenwirth A, Jarret L. *Métodos y diagnósticos del laboratorio clínico.* La Habana: Editorial científico técnica; 1986.
9. *Diccionario terminológico de ciencias médicas (m-z).* La Habana. Editorial científico técnica; 2004.
10. Colectivo de autores (cecam). *Informática médica (bioestadística).* La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2004.p.260.
11. Cardellá Lidia. *Bioquímica médica. T3* La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2004
12. Cruz Celso. *Temas de laboratorio clínico.* La Habana: Edimed; 2004.p. 220–300.
13. Struck M, Watkins H. Determination of glucose and glicosilated haemaglobin in one hundred case with hypertension rates. *clin chemistry* 2004; 14: 350–80.
14. Roca Reynaldo. *Temas de medicina interna. 4ed* Ciudad de la Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2002.p.120.
15. Colectivo de autores. *Selección de texto de laboratorio clínico para técnicos básicos.* Ciudad de la Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2002.
16. Young NS. Instrumental analize and the method of calibration in photolorimetrics equipment in clinical chemistry. *Br. Med. J* 2005; 309: 911–8.
17. Henry B, Cannon H. *Diagnóstico en química clínica. 3ed.* Phyladelfia: Editorial Progress Research; 1998.
18. Marchman P. Reflectometry method for the use of glucosimeter. *Lab. Médica* 2003; 8: 15–20.
19. Miller H. Method of urea, glucose and creatinine in serum of patient with leukemia. *Clin. Chemistry.* 2003; 18: 20-5.
20. Apav Jorgelina. *Introducción a la salud pública.* Ciudad de la Habana: ECIMED; 2004.p.345–60.

Recibido: 20 de noviembre de 2006

Aprobado: 11 de abril de 2007

Dra. Gricel Rosquete López. *Especialista en I Grado de Laboratorio Clínico. Profesor Asistente. Instituto Superior de Ciencias Médicas "Carlos J Finlay". Camagüey*