

Instituto Superior de Medicina Militar "Dr. Luis Díaz Soto"

VALORES DE REFERENCIA PARA LA DETERMINACIÓN DE RIBOFLAVINA SÉRICA

Dr. Pedro Luis Pérez Gastell,¹ Dr. Ricardo Hernández Royero,² y Lic. Armando Amador Armenteros³

RESUMEN

Los valores de referencia para la cuantificación de riboflavina (vitamina B₂) sérica fueron establecidos en el presente trabajo a partir de una muestra del personal que recibe asistencia en los servicios del Instituto Superior de Medicina Militar "Dr. Luis Díaz Soto". Se estudiaron 88 sujetos de uno y otro sexos, con edades entre 17 y 50 a. Todos cumplían la condición de supuestamente sanos según criterios aplicados. La vitamina B₂ fue cuantificada por un proceder analítico de tipo fluorimétrico desarrollado por *Natelson* y otros. Mediante el control de calidad de esta técnica se pudieron obtener resultados aceptables en la precisión con coeficientes de variación de 5,27 y 3,74 % para la reproducibilidad y repetibilidad respectivamente, y en la exactitud con coeficiente de correlación de 0,99 y un índice de recuperación de 96,96 %. Según el análisis estadístico de los datos de la muestra se estableció que la variable vitamina B₂ tenía una distribución logarítmica normal. No se encontraron diferencias significativas según el sexo. El recorrido de valores de referencia cuantificados se enmarcó en un límite mínimo de 5,01 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ y máximo de 9,57 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$, con una media de 7,29 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$, expresado como $X \pm 2\text{DE}$. Estos valores se insertan razonablemente en el entorno de los recorridos informados por otros autores, obtenidos por iguales o diferentes métodos.

Descriptor DeCS: RIBOFLAVINA/sangre; VALORES DE REFERENCIA; CONTROL DE CALIDAD.

La riboflavina, clasificada como vitamina B₂, está presente en la sangre y tejidos en forma de riboflavina libre, de mononucleótido de flavina (FMN) y dinucleótido de adenina y flavina (FAD); cofactores de enzimas deshidrogenasas, L

y D aminoácido oxidasas y xantina oxidasas. Se excreta por la orina como uroflavina y está presente en el hígado, cereales, levaduras, leche, huevo y ve-getales verdes.¹ Su necesidad diaria es de 1-2 mg.

El síndrome de deficiencia se caracte-

¹ Especialista de I Grado en Laboratorio Clínico.

² Especialista de I Grado en Bioquímica Clínica. Profesor Auxiliar.

³ Licenciado en Bioquímica.

riza por molestia en la garganta, hiperemia, edema de mucosa faríngea y bucal, queilosis, estomatitis angular, glositis, dermatitis seborreica y anemia normocrómica por hiperplasia de la serie roja de la médula ósea. En realidad su deficiencia aparece casi siempre combinada con otras deficiencias vitamínicas.^{1,2}

Muchos autores han determinado la riboflavina en orina,³⁻⁸ o en suero por diferentes procedimientos como el de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC),⁸⁻¹¹ enzimáticos como el de la glutatión reductasa¹²⁻¹⁴ o fluorimétricos.^{15,16}

Por la necesidad imperante que tienen muchos médicos de conocer el estado vitamínico de sus pacientes, y porque en muchos centros hospitalarios no existen técnicas para su detección, se ha propuesto instrumentar y estandarizar un procedimiento para la cuantificación de riboflavina.

MÉTODOS

La investigación comprendió el período de junio de 1997 a junio de 1998. Se seleccionó una muestra de 88 individuos supuestamente sanos, entre 17 y 50 a, de uno y otro sexos que recibieron asistencia en los servicios del Instituto Superior de Medicina Militar (ISMM) "Dr. Luis Díaz Soto".

Se cuantificó la riboflavina sérica mediante el método analítico de Natelson y otros.¹⁵

Control de calidad del procedimiento técnico

Para establecer la calidad de los procedimientos técnicos se determinó la precisión y la exactitud.

Precisión. Se calcularon la media (\bar{X}),

la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV), y a partir de estos se determinaron los valores máximos y mínimos de reproducibilidad y repetibilidad. Para los análisis ulteriores se utilizaron los valores de reproducibilidad.

Exactitud. Se preparó una curva de calibración montada varias veces, con patrones de 5, 10, 20 y 40 $\mu\text{g/dL}$, y se calculó el promedio de intercepto, pendiente y coeficiente de correlación.

Se estudió el índice de recuperación.

Se calculó la varianza del método, dato necesario para el cálculo de los valores de referencia.

Análisis estadístico. Se determinó el tipo de distribución de los valores mediante la prueba de bondad de ajuste para una distribución normal (chi cuadrado) y el gráfico de distribución de frecuencia.

Se estableció el recorrido de referencia, estimado según tipo de distribución en el intervalo $\bar{X} + 2\text{DE}$ de la muestra seleccionada.

Se calculó la varianza estimada (VE) para establecer unida a la varianza del método (VM), la varianza poblacional (VP) según la fórmula siguiente:

$$VE = VM + VP$$

Se despeja de la manera siguiente:

$$VP = VE - VM$$

El valor de la VP se utilizó para calcular el recorrido de referencia de la población.

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete STATISTIC.

RESULTADOS

El CV obtenido en el análisis de la reproducibilidad fue de 5,27 % (tabla 1).

El control de la exactitud presentó un

TABLA 1. *Análisis de la precisión*

	Repetibilidad n= 20	Reproducibilidad n=20
\bar{X}	11,709	11,4045
DE	0,4388	0,60109
$\bar{X} + 2DE$	12,5866	12,6066
$\bar{X} - 2DE$	10,8314	10,2023
CV	3,74 %	5,27 %

coeficiente de correlación de 0,99 y un índice de recuperación del 96,96 %.

El resultado de la VM fue 0,36.

Los valores de riboflavina no mostraron diferencia significativa entre los grupos del sexo femenino y masculino, en la aplicación de la prueba estadística t de Student ($p > 0,05$). Al no existir diferencias significativas, se unieron todos los valores en un solo grupo y se aplicó, como indican algunos autores,^{17,18} el método estadístico para buscar el tipo de distribución (prueba de bondad de ajuste para una distribución normal) y el gráfico de distribución

de frecuencia, lo que dio como resultado que la hipótesis acerca de que los valores séricos de riboflavina en la muestra de la población estudiada se distribuyeran normalmente debía ser rechazada con una $p > 0,05$ (tabla 2), por lo que la distribución es log-normal.

Los criterios de la distribución

TABLA 2. *Análisis de la distribución de los valores obtenidos*

N	88
\bar{X}	7,53056818
DE	1,97035871

$p > 0,05$.

Gausiana no se pueden aplicar directamente a la distribución log-normal, por lo que se decidió calcular el promedio geométrico (\bar{X}_g), que se determina igual que la media aritmética pero a partir de los logaritmos de los datos originales (tabla 3).

Se aplicó nuevamente la prueba de bon-

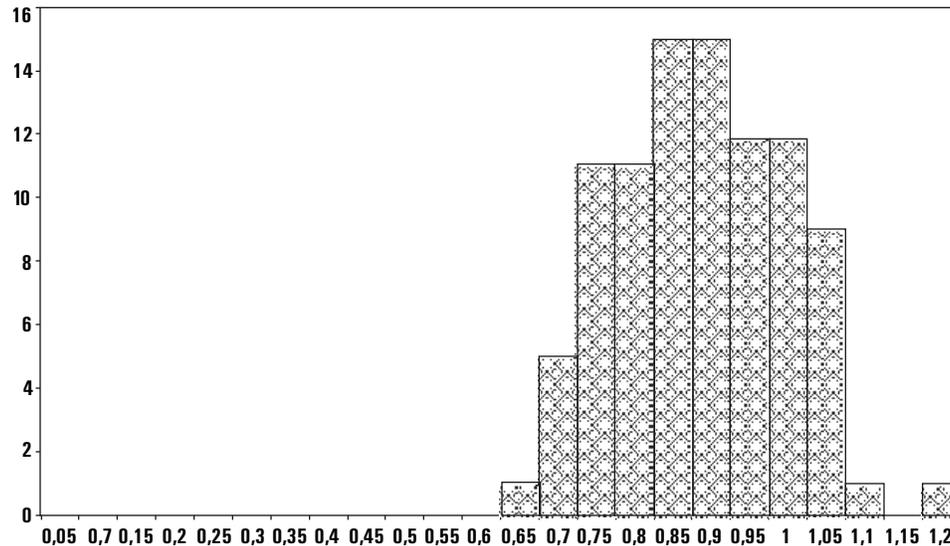


Fig. *Distribución de frecuencias con los valores transformados logarítmicamente.*

TABLA 3. *Análisis de la distribución de los valores transformados logarítmicamente*

N	88
\bar{X}_g	0,86267631
DE	0,11094898

$p > 0,05$.

dad de ajuste y el gráfico de distribución de frecuencia (fig.) y resultó que la hipótesis acerca de que la población se distribuyera normalmente no debió ser rechazada con una $p < 0,05$ (tabla 3).

Para poder establecer el recorrido de referencia de la muestra estimada hubo que hallar el antilogaritmo de la \bar{X} y la DE y se le estimó la varianza (VE) (tabla 4).

Al utilizar la varianza estimada (VE),

TABLA 4. *Resultados de los antilogaritmos y de la varianza*

\bar{X}	7,29
DE	1,29
$\bar{X} + 2DE$	9,87
$\bar{X} - 2DE$	4,71
VE	1,6641

junto a la varianza del método (VM), se calculó la varianza de la población (VP).

$$VP = VE - VM$$

$$VP = 1,6641 - 0,36$$

$$VP = 1,30$$

Se halló la raíz cuadrada al valor de la VP y se obtuvo la DE igual a 1,1401, a partir de lo cual se estableció el recorrido de referencia para la población, expresado este como $\bar{X} \pm 2DE$ (tabla 5).

El valor \bar{X} del recorrido de referencia

TABLA 5. *Recorrido de referencia poblacional*

\bar{X}	7,29
DE	1,14
2DE	2,134
$\bar{X} - 2DE$	5,01
$\bar{X} + 2DE$	9,57

calculado para la población estudiada fue de 5,01 a 9,57 $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$, con una \bar{X} de 7,29 $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$ según el método estadístico aplicado.

DISCUSIÓN

El CV obtenido en la precisión se categorizó de bueno al igual que el coeficiente de correlación y el índice de recuperación en la exactitud de acuerdo con la escala internacional establecida.

Natelson con la técnica de referencia encontró en su trabajo¹⁵ de 1 a 85 $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$ (promedio 25) y *Henry*¹⁹ de 2,6 a 3,7 $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$. Este último utilizó además un método microbiológico y halló valores de 4 a 24 $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$. *Heil*²⁰ encontró de 4 a 24 $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$ con el uso de HPLC.

Las diferencias encontradas en el presente trabajo, con los datos reportados por los autores mencionados, pudieran radicar en los hábitos alimentarios de las diferentes poblaciones estudiadas y en la diferencia de las fechas en que se realizaron los estudios; aunque también podrían imputarse a detalles en la ejecución del procedimiento y a los equipos utilizados. Como este proceder se controló rigurosamente, la hipótesis más probable sería atribuir a las diferencias de las poblaciones, la causa de estas divergencias.

El proceder de *Natelson*, a pesar de ser laborioso y de no constituir una microtécnica, demostró poseer precisión y exactitud. Otra ventaja que presenta es que los reactivos utilizados son de fácil adquisición y preparación. Por tales razones, y valorada la importancia clínica de poder contar con la cuantificación de la riboflavina sérica, se decidió implementar esta técnica en el servicio de Laboratorio Clínico del ISMM "Dr Luis Díaz Soto".

Por limitación de recursos materiales

solo se cuantificó la riboflavina dentro del complejo B, pero debe recordarse que las deficiencias de vitaminas de este grupo suelen estar relacionadas entre sí, y la cuantificación de una de ellas, en la mayoría de los casos puede servir como dato orientador sobre el estado nutricional del sujeto y para sustentar recomendaciones terapéuticas que procedan.

La investigación realizada evidenció que la aplicación en el ISMM "Dr. Luis Díaz Soto" del procedimiento de Natelson

fue preciso y exacto, comprobada por los valores del coeficiente de variación y el índice de recuperación obtenidos. La diferencia de sexo no influyó en los valores promedio de la población adulta estudiada. Los valores de referencia establecidos mediante este estudio para la determinación de riboflavina sérica en el área de salud sometida a investigación fueron de 5,01 a 9,57 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$.

SUMMARY

Reference values for quantification of serum riboflavin (vitamin B₂) were set in the present paper on the basis of a sample of patients who received medical assistance in the different departments of "Dr Luis Díaz Soto" Higher Institute of Military Medicine. 88 subjects of both sexes aged 17-50 years were studied. All of them fulfilled the condition of being supposed healthy subjects according to applied criteria. Vitamin B₂ was quantified by fluorometric analytical method developed by Natelson et al. Through the quality control of this technique, acceptable results were achieved in precision, with variation coefficients of 5.27 and 3.74 % for reproducibility and repeatability respectively, and in accuracy with correlation coefficient of 0.99 and a recovery index of 96.96 %. According to the statistical analysis of data from the sample, it was shown that vitamin B₂ variable had normal logarithmic distribution. No significant differences were found between sexes. The quantified reference values range was set within a minimum limit of 5.01 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ and a maximum limit of 9.57 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$, with a mean value of 7.29 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$, expressed as $\bar{X} \pm 2\text{DS}$. These values are reasonably included in the context of those reference ranges reported by other authors and obtained by the same or different methods.

Subject headings: RIBOFLAVIN/blood; REFERENCE VALUES; QUALITY CONTROL.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Braunwald E. Harrison: Principios de Medicina Interna. 8 ed. México: Interpanamericana; 1994. 112-40.
2. Fischbach F. Laboratory & diagnostic test. 4 ed. Philadelphia: J.B. Lipincott; 1992. 1385-412.
3. Wu-ZL, Chen-FX, Lai-YH. Mechanism and prevention of hemolysis in jaundiced infants in phototherapy. *Chung Hua. I Hsueh tsa chin* 1994;74(6):364-6, 364-9.
4. Mack CP. Myocardial flavin reductase and riboflavin: a potential role in decreasing reoxygenation injury. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;212(1):35-40.
5. Kodentsova V, Urzheinskaia OA. Vitamin Metabolism in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *Vopr Med Khim* 1994;40(4):33-8.
6. Thilothammal N, Baen K, Gandhimathy S. Testing compliance of drug taking o simple bed side method. *Indian Pediatr* 1995;32(3):295-9.
7. Kondesntsova V, Urzhsinslciaa OA, Abramova EI. Refining Criterio for providing adults and 12-14 year old children with vitamins B1 and B2. *Vopr Med Kim* 1994;40 (6):45-8.
8. Porcelli PJ, Adcok EW, Del Paggio D. Plasma and urine riboflavin and piridoxine concentrations in enterally fed very-low-birth-weight neonates. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1996;23(2):141-6.
9. Zemileni J, Link G, Bitsch I. Intrauterine vitamime B2 uptake of preterm and full-term infants. *Pediatr Res* 1995;38(4):585-91.
10. Kodentsova V, Urzhesinskaia OA. Determining riboflavin in biological samples. *Prike Biokhim Mikrobiol* 1994;30 (4-5):603-9.

11. Zempleni J, Galloway JR, MC Cormick B. The Identification and Kinetics of 7 alphahydroxy riboflavin in blood plasma from humans followings oral administration of riboflavin supplements. *Int J Vitam Nutr Res* 1996;66(2):151-7.
12. Dror Y, Stern F Komanitsky M. Optimal and stable conditions for the determination of entrocite glutathione reductase activation coeficient to evaluate riboflavin status. *Int J Vitam Nutr Res* 1994;64(4):257-62.
13. Mulherim DM, Thunan DI, Situnayake RD. Glutathione reductase activity, riboflavin status, and disease activity in reumathoid arthritis. *Am Rheum Dis* 1996;55(11):837-40.
14. Ramos JL, Barreto, OC, Nonoyama K. Vitamine depender erithrocyte enzyenes in newboms in relation to gestational age and birth weight. *J Perinat Med* 1996;24(3):221-5.
15. Natelson S. *Microtécnica de Química Clínica*. Barcelona: Torray SA;1964:426-9.
16. Kondentsova V, Vrzhesinokaya ON, Spinchev VB. Fluorometric riboflavin in plasma boy riboflavin biding as a method for vitamin B2 status assessmin *Ann Nutr Metabol* 1995;39(6):335-60.
17. Thielmann K. *Principios de metodología en bioquímica clínica*. La Habana: Organismos; 1973. 23-7.
18. Boquet E, Castillo M, Cáceres A, Dybkaer R, Escutia V, Francini G. *Mejoría continua de la calidad. Guía para los laboratorios clínicos de América Latina, México DF: Panamericana;1995:53-6*
19. Henry J. *Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio* 9 ed. Científico y Técnica;1993:52-4.
20. Heil W, Koberstein R. Zaurta B. *Reference Ranges for adults and children. Pre-analytical considerations. Boehringer Mannheim;1997:42-3.*

Recibido: 26 de mayo del 2000. Aprobado: 29 de junio del 2000.

Dr. *Pedro Luis Pérez Castell*. Instituto Superior de Medicina Militar "Dr. Luis Díaz Soto". Avenida Monumental, Habana del Este, CP 11700, Ciudad de La Habana, Cuba.