

Estudi comparatiu de diferents mètodes d'anàlisi de lactat sanguini*

Estudio comparativo de diferentes métodos analíticos de lactato sanguíneo*

F.A. Rodríguez^{1,2}, M. Banquells¹, V. Pons¹, F. Drobnic¹, P.A. Galilea¹

(1) Centre d'Alt Rendiment, Departament de Fisiologia i Valoració Funcional, Sant Cugat del Vallès, Barcelona.

(2) Institut Nacional d'Educació Física de Catalunya, Departament de Ciències Mèdiques, Barcelona

RESUM

L'objectiu de l'estudi és verificar la precisió, exactitud i linealitat de tres mètodes d'anàlisi de lactat sanguini, i comparar llurs resultats. Els mètodes estudiats són l'anàlisi enzimàtica mitjançant fotòmetre (FE) i tres mètodes electroenzimàtics semiautomàtics (EE1, EE2, EE3). Hem mesurat patrons de quatre concentracions diferents de l-lactat entre 2.39 i 24.20 mmol.l⁻¹. Per la comparació s'han utilitzat mostres duplicades de sang capil·lar obtingudes simultàniament del lòbul d'ambdues orelles durant i després d'una prova d'esforç en cinta rodant.

La precisió i exactitud dels tres mètodes en la medicació de patrons estàndard és elevada en tot el rang de valors (CV mig = 1.78 - 3.38%; diferència mitja = 1.81 - 6.57%). La correlació entre els tres mètodes és elevada ($r = 0.913 - 0.946$), però s'aprecien valors sistemàticament menors als tres mètodes electroenzimàtics, que oscil·len entre 0.1-1.2 (pel nivell de 5 mmol.l⁻¹) i 3.4-5.7 (pel nivell de 20 mmol.l⁻¹). Les diferències es redueixen dràsticament quan s'afegeix prèviament un hemolitzant i inhibidor de la glucòlisi a la mostra de sang.

Els valors obtinguts en sang capil·lar mitjançant els tres mètodes no són equivalents. Les diferències s'atribueixen, parcialment, al fet que el mètode FE mesura concentracions de lactat sanguini total, mentre que els EE mesuren només la fracció plasmàtica-extraeritrocitària. El mètode fotoenzimàtic presenta avantatges que el fan el mètode d'elecció. No obstant, es presenten equa-

RESUMEN

El objetivo del estudio es verificar la precisión, exactitud y linealidad de tres métodos de análisis de lactato sanguíneo y comparar sus resultados. Los métodos estudiados son el análisis enzimático mediante fotómetro (FE) y tres métodos electroenzimáticos semiautomáticos (EE1, EE2, EE3). Se utilizaron patrones de cuatro concentraciones diferentes de l-lactato entre 2.39 y 24.20 mmol.l⁻¹. Para la comparación se han utilizado muestras duplicadas de sangre capilar obtenidas simultáneamente del lóbulo de ambas orejas durante y después de una prueba de esfuerzo en cinta rodante.

La precisión y exactitud de los tres métodos en la medición de patrones estándar es elevada en todo el rango de valores medio (CV = 1.78 - 3.38%; diferencia media = 1.81 - 6.57%). La correlación entre los tres métodos es elevada ($r = 0.913 - 0.946$), pero se aprecian valores sistemáticamente menores en los tres métodos electroenzimáticos que oscilan entre 0.1-1.2 (para el nivel de 5 mmol.l⁻¹) y 3.4-5.7 (para el nivel de 20 mmol.l⁻¹). Las diferencias se reducen casi a la mitad al utilizar un hemolizante e inhibidor de la glucólisis.

Los valores obtenidos en sangre capilar mediante los tres métodos no son equivalentes. Las diferencias se atribuyen, parcialmente, a que el método FE mide concentraciones de lactato sanguíneo total, mientras que los EE miden sólo la fracción plasmática-extraeritrocitaria. El método fotoenzimático presenta ventajas que lo convierten en el método de elección. No obstante se

(*) Premi "Dr. Emili Moragas 1990", atorgat per la Societat Catalana de Medicina de l'Esport, Acadèmia de Ciències Mèdiques de Catalunya i de Balears.

cions de regressió que permeten estimar els valors equivalents quan s'utilitzen els mètodes semiautomàtics EE, més ràpids i menys laboriosos.

Paraules clau

l-lactat, lactat sanguini, anàlisi enzimàtic, exercici, valoració funcional.

presentan ecuaciones de regresión que permiten estimar los valores equivalentes si se utilizan los métodos semiautomáticos EE, más rápidos y menos laboriosos.

Palabras clave

l-lactato, lactato sanguíneo, análisis enzimático, ejercicio, valoración funcional.

Introducció

La determinació de lactat sanguini és actualment pràctica rutinària en la major part de laboratoris d'esforç. L'interès en la fisiologia i valoració funcional, lluny d'ésser recent⁷ ha augmentat des de la consolidació dels conceptes relatius al llindar anaeròbic^{8, 25}, llindar de lactat^{5, 6, 9, 13} i OBLA^{10,11} i l'estimació de les vies anaeròbiques de producció d'energia en esforços intensos.^{14, 21}

L'ús de micromètodes ha significat un salt qualitatiu important en permetre l'anàlisi en petites mostres de sang capil·lar arterialitzada del lòbul de l'orella o la punta dels dits^{4, 9, 13}, en comptes de sang venosa o arterial. Els mètodes probablement més utilitzats actualment per la determinació de l-lactat en sang són:

- Mètodes fotoenzimàtics (FE), basats en la determinació fotomètrica de l'increment de NADH en la reacció enzimàtica lactat-piruvat mitjançant LDH, GPT i NAD, estoiquiomètricament relacionat amb la concentració de lactat.^{18, 24}
- Mètodes electroenzimàtics (EE) o enzimopolarogràfics, basats en la proporció lineal existent entre la concentració de lactat en una mostra i la producció de peròxid d'hidrogen (H₂O₂), que genera un corrent registrat per un electrode específic -ànode de plati-^{3, 4}
- Mètodes d'injecció de flux ("flow injection analysis", FIA), basats en la dispersió controlada d'una mostra injectada en un transportador no segmentari en moviment continu o flux de reactiu^{12, 23}

L'objectiu del present estudi és verificar la validesa, precisió i linealitat d'un mètode FE i dos EE correntment utilitzats en els laboratoris d'esforç, i comparar llurs resultats, tant en mostres patró obtingudes per dilució com en mostres de sang capil·lar durant l'esforç i la recuperació.

Material i mètodes

Instruments

Fotòmetre 4020 (Hitachi/Boehringer Mannheim,

Introducción

La determinación de lactato sanguíneo es actualmente práctica rutinaria en la mayoría de laboratorios de esfuerzo. Su interés en fisiología y valoración funcional, lejos de ser reciente⁷ ha aumentado desde la consolidación de los conceptos relativos al umbral anaeróbico^{8, 25}, umbral de lactato^{5, 6, 9, 13} y OBLA^{10,11} y la estimación de las vías anaeróbicas de producción de energía en esfuerzos intensos.^{14, 21}

El uso de micrométodos ha significado un salto cualitativo importante al permitir el análisis en pequeñas muestras de sangre capilar arterializada obtenida en lóbulo de la oreja o la yema de los dedos^{4, 9, 13}, en vez de sangre venosa o arterial. Los métodos probablemente más utilizados en la actualidad para la determinación de l-lactato en sangre son:

- Métodos fotoenzimáticos (FE), basados en la determinación fotométrica del incremento de NADH en la reacción enzimática lactato-piruvato mediante LDH, GPT y NAD, estoiquiométricamente proporcional a la concentración de lactato.^{18, 24}
- Métodos electroenzimáticos (EE) o enzimopolarográficos, basados en la proporción lineal existente entre la concentración de lactato en una muestra y la producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), que genera una corriente registrada por un electrodo específico -ánodo de platino-^{3, 4}
- Métodos de inyección de flujo ("flow injection analysis", FIA), basados en la dispersión controlada de una muestra injectada en un transportador no segmentario en movimiento continuo o flujo de reactivo^{12, 23}

El objetivo del presente estudio es verificar la validez, precisión, linealidad de un método FE y dos EE corrientemente utilizados en los laboratorios de esfuerzo, y comparar sus resultados, tanto en muestras patró obtenidas por dilución como en muestras de sangre capilar durante el esfuerzo y la recuperación.

Tokyo, Japan), amb filtre de longitud d'ona de 340 nm. Micro Stat PLM4 (Analox Instruments Ltd., London, GB).

Analitzador electroenzimàtic YSI 23L (Yellow Springs Instruments Co., Ohio, USA).

L'utilatge complementari de laboratori consta de pipetes semiautomàtiques de volum fix (Eppendorf, RFA), capil.lars (20, 25 y 50 µl) i material convencional per la presa de mostres.

Reactius

Test Combination per Medicina Esportiva (Boehringer Mannheim, RFA, ref. 1178750), conté també, NAD, GPT i LDH. Àcid perclòric 0.33 mmol.l⁻¹ (Boehringer Mannheim, RFA, ref. 125369). Solució lactat (Analox Instruments Ltd. London, GB, ref. GMRD 090/091/092), conté també i enzim lactat-oxidasa. També i lactat-oxidasa (Yellow Springs Instruments Co., Ohio, USA). Octyl-fenoxi-polietoxietanol (Triton X-100, Sigma Chemical Co. T-6878) i fluorur sòdic (NaF).

Control de qualitat

Precinorm S (Boehringer Mannheim, RFA, ref. 125130), mostres patró de l-lactat entre 2.39 i 24.40 mmol.l⁻¹.

Controls de 8.0, 5.0 y 15.0 mmol.l⁻¹ per la calibració dels mètodes electroenzimàtics.

Precisió i exactitud

Els patrons de l-lactat emprats en el test de precisió i exactitud foren de 2.39, 4.97, 14.78 i 19.61 mmol.l⁻¹ – 20 medicions per cada patró. Es prepararen diluint l-lactat estàndard de 1.0 mol.l⁻¹ amb àcid perclòric de 0.33 mol.l⁻¹.

En tots els casos es calibrà degudament l'utilatge abans i durant les medicions, seguint les instruccions del fabricant. Totes les medicions, van ser realitzades al mateix laboratori en condicions de temperatura similars (24+/-2°C).

Els estadístics utilitzats són mitjana (\bar{X}), desviació estàndard (S_x), coeficient de variació de Pearson (CV) i error estàndard (SEM).

Linealitat

Per al test de linealitat es van mesurar 11 patrons (2.39, 4.97, 7.93, 9.90, 11.85, 14.78, 16.71, 17.68, 19.61, 22.48, 24.40 mmol.l⁻¹). Totes les medicions per duplicat, fent servir la mitjana com valor per al càlcul estadístic i la representació gràfica de l'equació de regressió.

Estudi comparatiu

Les mostres de sang capil.lar analitzades (20 µl) s'obtingueren per punció bilateral i simultània al lòbul de l'orella del mateix subjecte, abans, durant i

Material y métodos

Instrumentos

Fotómetro 4020 (Hitachi/Boehringer Mannheim, Tokyo, Japan), con filtro de longitud de onda de 340 nm. Micro Stat PLM4 (Analox Instruments Ltd., London, GB).

Analizador electroenzimático YSI 23L (Yellow Springs Instruments Co., Ohio, USA).

El utillaje complementario de laboratorio consta de pipetas semiautomáticas de volumen fijo (Eppendorf, RFA), capilares (20, 25 y 50 µl) y material convencional para la toma de muestras.

Reactivos

Test Combination per Medicina Deportiva (Boehringer Mannheim, RFA, ref. 1178750), contiene tampón, NAD, GPT i LDH. Ácido perclórico 0:33 mmol.l⁻¹ (Boehringer Mannheim, RFA, ref. 125369). Solución lactato (Analox Instruments Ltd. London, GB, ref. GMRD 090/091/092), contiene tampón y enzima lactato oxidasa. Tampón y lactato-oxidasa (Yellow Springs Instruments Co., Ohio, USA). Octyl-fenoxi-polietoxietanol (Triton X-100, Sigma Chemical Co. T-6878) y fluoruro sódico (NaF).

Control de calidad

Precinorm S (Boehringer Mannheim, RFA, ref. 125130), muestras patrón de l-lactato entre 2.39 y 24.40 mmol.l⁻¹.

Controles de 8.0, 5.0 y 15.0 mmol.l⁻¹ para el calibrado de los métodos electroenzimáticos.

Precisión y exactitud

Los patrones de l-lactato empleados en el test de precisión y exactitud fueron de 2.39, 4.97, 14.78 y 19.61 mmol.l⁻¹ – efectuándose 20 mediciones para cada patrón. Se prepararon diluyendo l-lactato estándar de 1.0 mol.l⁻¹ con ácido perclórico de 0.33 mol.l⁻¹.

En todos los casos se calibró debidamente el utillaje antes y durante las mediciones siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las mediciones se realizaron en el mismo laboratorio en condiciones de temperatura similares (24+/-2°C).

Los estadísticos utilizados son media (\bar{X}), desviación estándar (S_x), coeficiente de variación de Pearson (CV) y error estándar (SEM).

Linealidad

Para el test de linealidad se tomaron 11 patrones (2.39, 4.97, 7.93, 9.90, 11.85, 14.78, 16.71, 17.68, 19.61, 22.48, 24.40 mmol.l⁻¹). Todas las mediciones se efectuaron por duplicado empleando la media como valor de cálculo estadístico y la representación gráfica de la ecuación de regresión.

després d'una prova d'esforç. La sang fou desproteïtzada immediatament amb àcid perclòric (200 µl).

Per al mètode electroenzimàtic mitjançant analitzador Analox (EE1), es van fer servir capil·lars amb heparina, fluoruror i nitrit. En el mètode electroenzimàtic mitjançant analitzador YSI 23 L (EE2), s'utilitzaren capil·lars heparinitzats. Amb el mateix instrument s'afegí també per una altra sèrie de mesures (EE3), un hemolitzant (Triton X-100), tampó i un inhibidor de la glucòlisi (NaF); 50 µl de mescla i 25 µl de sang. Les quantitats de la mescla són les següents: 25 ml de tampó, 50 µl de Triton X-100 i 0.5 mg de la NaF.

Per al tractament estadístic es va calcular l'error estàndard de la mitjana (SEM), el coeficient de correlació de Pearson (r) i l'equació de regressió lineal ($y = ax + b$). Es valoraren els diferents mètodes per parelles, prenent com a referència (variable independent, x) el mètode FE.

Mètode d'assaig

Mètode FE. 500 µl de solució reactiva i 25 µl d'àcid perclòric (blanc), o 25 µl de sobrenadant (mostra). El temps d'incubació fou de 30 min. a temperatura ambient.

Mètode EE. La mostra de sang s'injectà directament a l'analitzador: 7 µl de sang total per a EE1, 25 µl de sang total per a EE2 i 25 µl de sang hemolitzada per a EE3. La lectura dels resultats fou directa en tots els casos tret del resultat del mètode EE3 (multiplicat pel factor 3).

Resultats

Precisió i exactitud

A la Taula 1 es presenten els resultats de l'assaig de 20 mostres per cada un dels patrons de l-lactat i per als tres mètodes. La precisió s'expressa com el valor de CV (%) i l'exactitud com les diferències entre el valor mig i el valor del patró (dif., %).

Els tres mètodes proporcionen nivells de precisió i exactitud dins d'un rang acceptable per a l'ús corrent a laboratoris de fisiologia de l'esforç, especialment tractant-se de micromètodes (CV mig = 1.78 - 3.38%, dif. mitja = 1.81 - 6.57%). El mètode més exacte i precís amb patrons de referència resulta ser el EE2, seguit pel FE i EE1, successivament.

Linealitat

A les figures 1, 2 i 3 es presenten les gràfiques de linealitat per a cada un dels mètodes.

La millor linealitat és l'obtinguda pel mètode FE ($r = 0.996$), lineal fins un valor superior a 22 mmol.l⁻¹. El mètode EE2 ($r = 0.988$) perd linealitat

Estudio comparativo

Las muestras de sangre capilar analizadas (20 µl) fueron obtenidas por punción bilateral y simultánea en el lóbulo de la oreja del mismo sujeto, antes, durante y después de una prueba de esfuerzo. La sangre fue desproteïnizada inmediatamente con ácido perclórico (200 µl).

En el método electroenzimático mediante analizador Analox (EE1), se utilizaron capilares con heparina, fluoruro y nitrito. En el método electroenzimático mediante analizador YSI 23 L (EE2), se usaron capilares heparinizados. Con el mismo instrumento se utilizó también para otra serie de ensayos (EE3), un hemolizante (Triton X-100), tampón y un inhibidor de la glucólisis (NaF), 50 µl de mezcla y 25 µl de sangre. Las cantidades de la mezcla son las siguientes: 25 ml de tampón, 50 µl de Triton X-100 y 0.5 mg de la NaF.

En el tratamiento estadístico se calculó el error estándar de la media (SEM), el coeficiente de correlación de Pearson (r) y la ecuación de regresión lineal ($y = ax + b$). Se valoraron los distintos métodos por parejas, teniendo como referencia (variable independiente, x) el método FE.

Método de determinación

Método FE. 500 µl de solución reactiva y 25 µl de ácido perclórico (blanco), o 25 µl de sobrenadante (muestra). El tiempo de incubación fue de 30 min. a temperatura ambiente.

Método EE. La muestra de sangre se inyectó directamente en el analizador. 7 µl de sangre total para EE1, 25 µl de sangre total para EE2 y 25 µl de sangre hemolizada para EE3. La lectura de los resultados fue directa en todos los casos exceptuando el resultado del EE3 (se multiplicó por el factor 3).

Resultados

Precisión y exactitud

En la Tabla 1 se presentan los resultados del ensayo de 20 muestras para cada uno de los patrones de l-lactato y para los tres métodos. La precisión se expresa como el valor de CV (%) y la exactitud como diferencias entre el valor medio y el valor del patrón (dif., %).

Los tres métodos proporcionan niveles de precisión y exactitud dentro de un rango aceptable para el uso corriente en laboratorios de fisiología del esfuerzo, especialmente teniendo en cuenta que se trata de micrométodos (CV medio = 1.78 - 3.38%, dif. media = 1.81 - 6.57%). El método más exacto y preciso con patrones de referencia resulta ser el EE2, seguido por el FE y EE1, sucesivamente.

LINEALIDAD FOTOENZIMÁTICO (FE)

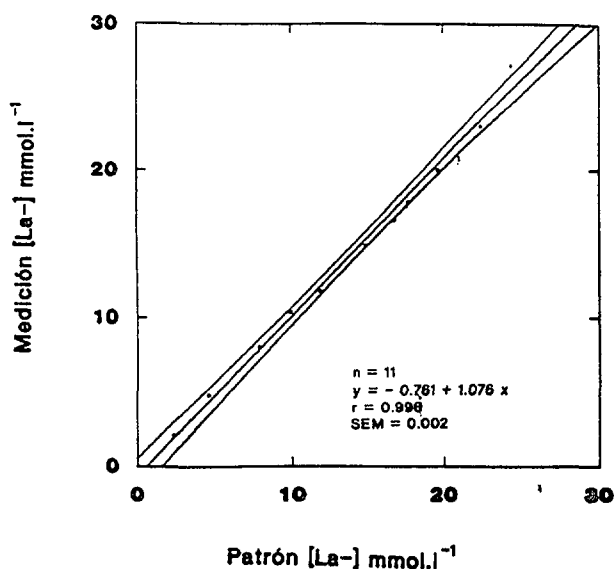


Figura 1. Linealitat del mètode fotoenzimàtic (FE). A la gràfica s'indiquen la recta de regressió i els límits de l'interval de confiança del 95%; també es presenten el tamany de la mostra (n), l'equació de regressió, el coeficient de correlació de Pearson (r) i l'error estàndard de la mitja (SEM).

Figura 1. Linealidad del método fotoenzimático (FE). En la gráfica se indican la recta de regresión y los límites del intervalo de confianza del 95%; también se presentan el tamaño muestral (n), la ecuación de regresión, el coeficiente de correlación de Pearson (r), y el error estándar de la media (SEM).

LINEALIDAD ELECTROENZIMÁTICO (EE1)

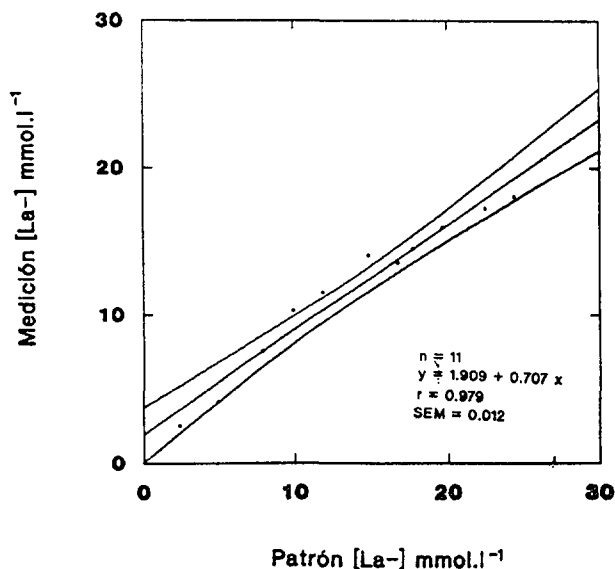


Figura 2. Linealitat del mètode electroenzimàtic (EE1). A la gràfica s'indiquen la recta de regressió i els límits de l'interval de confiança del 95%; també es presenten el tamany de la mostra (n), l'equació de regressió, el coeficient de correlació de Pearson (r) i l'error estàndard de la mitja (SEM).

Figura 2. Linealidad del método electroenzimático (EE1). En la gráfica se indican la recta de regresión y los límites del intervalo de confianza del 95%; también se presentan el tamaño muestral (n), la ecuación de regresión, el coeficiente de correlación de Pearson (r), y el error estándar de la media (SEM).

per a un valor aproximat de 17 mmol.l⁻¹, i el EE1 (r=0.979) per a un valor de 14 mmol.l⁻¹, la qual cosa confirma la necessitat de diluir o fraccionar la mostra, segons el mètode.

Estudi comparatiu

A les Figures 4, 5 i 6 es presenten gràficament els resultats de l'anàlisi de regressió pels parells de mostres analitzades amb cada un dels mètodes EE (ordenades), en funció del valor mig del mètode FE (abcises).

Els tres mètodes d'assaig no proporcionen valors equivalents. Amb els mètodes electroenzimàtics (EE1, EE2, EE3), s'obtenen valors notablement inferiors al fotoenzimàtic (FE). A la Taula 2 es presenten les equacions de regressió corresponents a cada mètode EE, en funció del FE, així com uns exemples de diferències entre els valors de regressió de cada mètode per a quatre nivells de medicació. El mètode EE3 –electroenzimàtic amb hemolitzant i inhibidor de la glucòlisi– obté els valors més propers al mètode FE.

Linealidad

En las Figuras 1, 2 y 3 se presentan las gráficas de linealidad para cada uno de los métodos.

La mejor linealidad es la obtenida por el método FE (r=0.996), lineal hasta un valor superior a 22 mmol.l⁻¹. El método EE2 (r=0.988) pierde linealidad para un valor aproximado de 17 mmol.l⁻¹, y el EE1 (r=0.979) para un valor de 14 mmol.l⁻¹, lo que confirma la necesidad de diluir o fraccionar la muestra, según el método.

Estudio comparativo

En las Figuras 4, 5 y 6 se presentan gráficamente los resultados del análisis de regresión para los pares de muestras analizadas con cada uno de los métodos EE (ordenadas), en función del valor medio mediante el método FE (abcisas).

Los tres métodos de ensayo no proporcionan valores equivalentes. Los métodos electroenzimáticos (EE1, EE2, EE3), obtienen valores notablemente inferiores al fotoenzimático (FE). En la Tabla

Discussió

La precisió i exactitud dels tres mètodes analítics comparats és bona, especialment tenint en compte que es tracta de micromètodes (7-25 µl de sang). Aquesta precisió és, fins i tot superior a l'obtinguda per altres autors amb el micromètodes FE^{4,22}. El mètode més exacte i precís amb patrons de referència és l'EE2, seguit pel FE i EE1, successivament. El mètode FE és menys precís pel rang de medició més baix, posiblement per efecte de la major dilució de la mostra patró respecte a les concentracions superiors. No obstant, considerem que la precisió i exactitud dels tres mètodes és suficient per als estudis convencionals en fisiologia i medicina de l'esport.

El mètode que presenta una millor linealitat és el FE, pràcticament en tot el rang possible de medició de mostres obtingudes en esportistes (< 25 mmol.l⁻¹). En els dos mètodes EE es confirma la necessitat de diluir o fraccionar la mostra per tal d'obtenir una linealitat suficient per damunt dels 14 mmol.l⁻¹ (EE1) i 16 mmol.l⁻¹ (EE2), respectivament, tal com consta a les instruccions dels dos mètodes per a valors fins i tot inferiors. La millor linealitat del mètode FE resulta de gran interès per la incertesa existent respecte al valor real d'una mostra - valors de lactat desconeguts "a priori".

Als manuals d'instruccions dels equips d'anàlisi EE (2,26), es fan comparacions amb el mètode FE com a referència. Els coeficients de correlació presentats són els dos casos molt superiors als tro-

Mètode (n=20)	Patrones 2.39	4.97	14.78	19.61	media
Fotoenzimàtic FE					
\bar{x}	2.29	5.34	14.60	19.99	
dif., ‡	-4.1	7.4	-1.2	1.9	3.65
CV, ‡	5.20	3.10	2.51	2.74	3.38
S _x	0.11	0.16	0.36	0.54	
SEM	0.02	0.03	0.08	0.12	
Electroenzimàtic EE1					
\bar{x}	2.51	4.45	15.75	18.75	
dif., ‡	5.0	-10.4	6.5	-4.3	6.57
CV, ‡	2.94	2.24	2.66	2.99	2.70
S _x	0.07	0.10	0.42	0.56	
SEM	0.02	0.02	0.10	0.12	
Electroenzimàtic EE2					
\bar{x}	2.39	5.06	14.70	19.30	
dif., ‡	0	5.2	-0.5	-1.5	1.81
CV, ‡	1.25	2.64	1.64	1.59	1.78
S _x	0.03	0.13	0.24	0.30	
SEM	0.00	0.03	0.05	0.06	

Taula 1. Precisió i exactitud de tres mètodes d'anàlisi de lactat, per quatre patrons de l-lactat. S'indiquen la mitja (X), diferències respecte al patró (dif. %), coeficient de variació (CV, %), desviació estàndard (S_x), i error estàndard.

Tabla 1. Precisión y exactitud de tres métodos de análisis de lactato, por cuatro patrones de l-lactato. Se indican la media (X), diferencias respecto al patrón (dif. %), coeficiente de variación (CV, %), desviación estándar (S_x), y error estándar.

2 se presentan las ecuaciones de regresión correspondientes a cada método, en función del FE, así como algunos valores de regresión para mostrar las diferencias entre los resultados para cuatro niveles de medición -desviación con respecto a la línea de identidad. Cuando el método electroenzimático se utiliza tratando previamente las muestras con un hemolizante y un inhibidor de la glucólisis (EE3), dichas diferencias se reducen drásticamente.

Discusión

La precisión y exactitud de los tres métodos analíticos comparados es buena, especialmente teniendo en cuenta que se trata de micrométodos (7-25 µl de sang). Esta precisión es, incluso, superior a la obtenida en otros estudios con el micrométodo FE^{4,22}. El método más exacto y preciso con patrones de referencia resulta ser el EE2, seguido por el FE y EE1, sucesivamente. El método FE es menos preciso para el rango de medición más bajo, posiblemente por efecto de la mayor dilución de la muestra patró respecto a las concentraciones superiores. No obstante, consideramos que la precisión y exactitud de los tres métodos es suficiente, cuando son evaluadas mediante patrones obtenidos por dilución.

El método que presenta una mejor linealidad es el FE prácticamente en todo el rango posible de medición de muestras obtenidas en deportistas (< 25 mmol.l⁻¹). En ambos métodos EE se confirma la necesidad de diluir o fraccionar la muestra para obtener una linealidad suficiente por encima de los 14 mmol.l⁻¹ (EE1) y 16 mmol.l⁻¹ (EE2), respectivamente, tal como consta en las instrucciones de ambos métodos para valores incluso inferiores. La mejor linealidad del método FE resulta de gran

Ecuación de regresión	Diferencias ($\bar{x}_{FE} - \bar{y}_{EE}$) [mmol.l ⁻¹]			
	5	10	15	20
YEE1 = 0.259 + 0.699 x _{FE}	1.2	2.7	4.2	5.7
YEE2 = 0.890 + 0.688 x _{FE}	0.6	2.2	3.7	5.3
YEE3 = 0.944 + 0.778 x _{FE}	0.1	1.2	2.3	3.4

Taula 2. Equacions de regressió per a cada mètode electroenzimàtic (EE) en funció del fotoenzimàtic (FE) [$Y_{EE} = f(x_{FE})$]. S'indiquen, com a exemple, les diferències entre els valors de regressió de cada mètode per quatre nivells de medició (5, 10, 15, 20 mmol.l⁻¹).

Tabla 2. Ecuaciones de regresión para cada método electroenzimático (EE) en función del fotoenzimático (FE) [$Y_{EE} = f(x_{FE})$]. Se indican, como ejemplo, las diferencias entre los valores de regresión de cada método para cuatro niveles de medición (5, 10, 15, 20 mmol.l⁻¹).

LINEALIDAD ELECTROENZIMATICO (EE2)

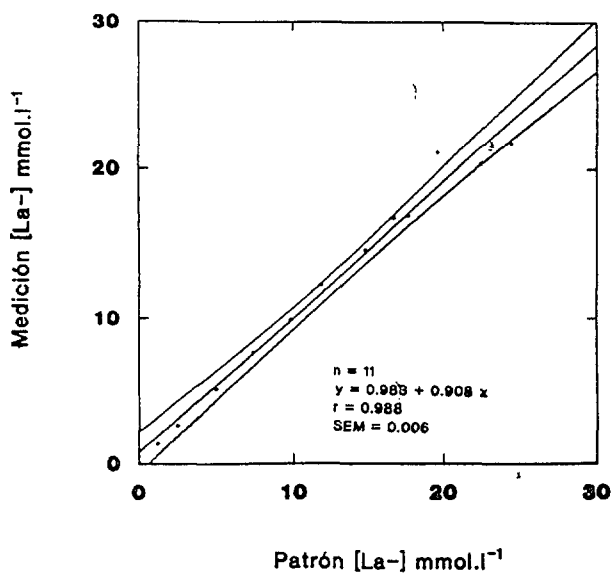


Figura 3. Linealitat del mètode electroenzimàtic (EE2). A la gràfica s'indiquen la recta de regressió i els límits de l'interval de confiança del 95%; també es presenten el tamany de la mostra (n), l'equació de regressió, el coeficient de correlació de Pearson (r) i l'error estàndard de la mitja (SEM).

Figura 3. Linealidad del método electroenzimático (EE2). En la gráfica se indican la recta de regresión y los límites del intervalo de confianza del 95%; también se presentan el tamaño muestral (n), la ecuación de regresión, el coeficiente de correlación de Pearson (r), y el error estándar de la media (SEM).

ESTUDIO COMPARATIVO (EE1)

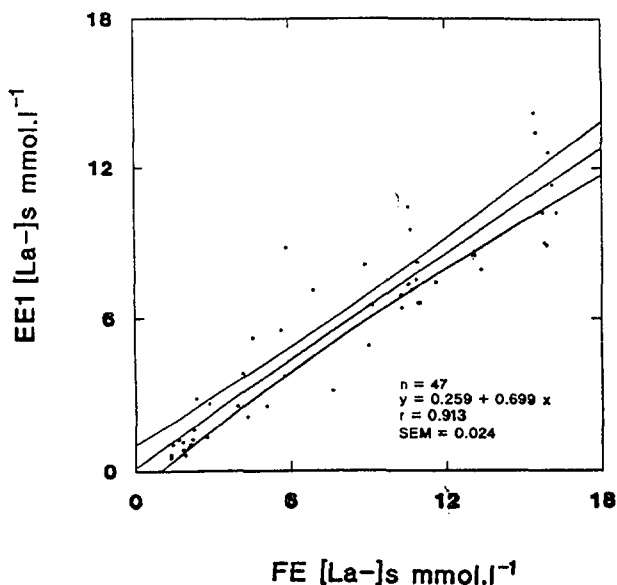


Figura 4. Comparació entre el mètode electroenzimàtic (EE1) i el fotoenzimàtic (FE).

A la gràfica s'indiquen la recta de regressió i els límits de l'interval de confiança del 95%; també es presenten el tamany de la mostra (n), l'equació de regressió, el coeficient de correlació de Pearson (r) i l'error estàndard de la mitja (SEM).

Figura 4. Comparación entre el método electroenzimático (EE1) y el fotoenzimático (FE).

En la gráfica se indican la recta de regresión y los límites del intervalo de confianza del 95%; también se presentan el tamaño muestral (n), la ecuación de regresión, el coeficiente de correlación de Pearson (r), y el error estándar de la media (SEM).

bats al nostre estudi. Segons els nostres resultats, els tres mètodes utilitzats no proporcionen valors equivalents. Els mètodes EE obtenen valors notablement inferiors al FE (veure Taula 2). Aquestes diferències són clarament inferiors quan la mostra de sang és tractada amb un hemolitzant i inhibidor de la glucòlisi (Triton X-100). En conclusió les esmentades diferències, són atribuïbles en la major part, encara que no totalment, al fet que els mètodes EE mesuren només el lactat extraeritrocitari –plasmàtic–, en tant que el mètode FE amb desproteïnitació mesura el lactat total –plasmàtic i intraeritrocitari. Cal considerar que part del lactat produït per la glucòlisi anaeròbica a la fibra muscular i que difon al compartiment plasmàtic, és capaç també de difondre a l'interior dels eritrocits. Així, la quantitat de lactat present al compartiment vascular –lactat sanguini– fóra la corresponent a la suma del lactat als dos subcompartiments –plasmàtics i intraeritrocitari–, sempre que la glucòlisi eritrocitària fóra inhibida, tal com passa al desproteïnitjar la

interés por la incertidumbre existente respecto al valor real de una muestra –valores de lactato desconocidos “a priori”.

En los manuales de instrucciones de los equipos de análisis EE,^{1,26} se efectúan comparaciones con el método FE como referencia. Los coeficientes de correlación presentados son en ambos casos muy superiores a los encontrados en nuestro estudio. Según nuestros resultados, los tres métodos utilizados no proporcionan valores equivalentes. Los dos métodos EE obtienen valores notablemente inferiores al FE (ver Tabla 2). Dichas diferencias son claramente inferiores cuando la muestra de sangre es tratada con un hemolizante e inhibidor de la glucólisis (Triton X-100). Concluimos que dichas diferencias son atribuibles en gran medida, aunque no totalmente, a que los métodos EE miden sólo el lactato extraeritrocitario. Debe considerarse que parte del lactato producido por la glucólisis anaeróbica en la fibra muscular y que difunde al compartimento plasmático, es capaz también de

mostra amb àcid perclòric immediatament després de l'extracció.

És freqüent trobar a la literatura especialitzada referències a concentracions de lactat durant o post-esforç obtingudes mitjançant mètodes d'anàlisi diferents. No s'acostuma a pensar a la possible discrepància, en funció del mètode analític utilitzat. Això resulta especialment rellevant quan s'utilitzen referències de lliandar de lactat o lliandar anaeròbic^{10, 11, 16}, o models d'intensitat d'entrenament basats en nivells de lactat sanguini.^{5, 6, 13, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22} Aquells laboratoris que segueixen aquestes referències poden, eventualment, fer servir estimacions basades en les equacions de regressió que presentem a la Taula 2 –predicció dels valors corresponents a un altre mètode d'anàlisi.

En conclusió, cal tenir en compte que no existeix equivalència entre els mètodes analítics més utilitzats actualment als laboratoris de fisiologia de l'exercici. La millor linealitat, bona precisió i, especialment, la millor validesa del mètode fotoenzimàtic

difundir al interior de los eritrocitos. Así, la cantidad de lactato presente en el compartimento vascular –lactato sanguíneo– sería la correspondiente a la suma del lactato en ambos subcompartimentos –plasmático e intraeritrocitario–, siempre que la glucólisis eritrocitaria fuese inhibida, tal como sucede al desproteínizar la muestra con ácido perclórico inmediatamente tras la extracción.

Es frecuente encontrar en la literatura especializada referencias a concentraciones de lactato durante o post-esfuerzo obtenidas mediante métodos de análisis distintos. No suele prestarse atención a las posibles discrepancias en función del método analítico. Esto resulta especialmente relevante cuando se discuten o comparan conceptos de "umbral de lactato" o "umbral anaeróbico"^{10, 11, 16} o modelos de intensidad de entrenamiento basados en niveles de lactato sanguíneo.^{5, 6, 13, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22} Aquellos laboratorios que utilicen dichas referencias, pueden, eventualmente, realizar estimaciones basadas en las ecuaciones de regresión que pre-

ESTUDIO COMPARATIVO

(EE2)

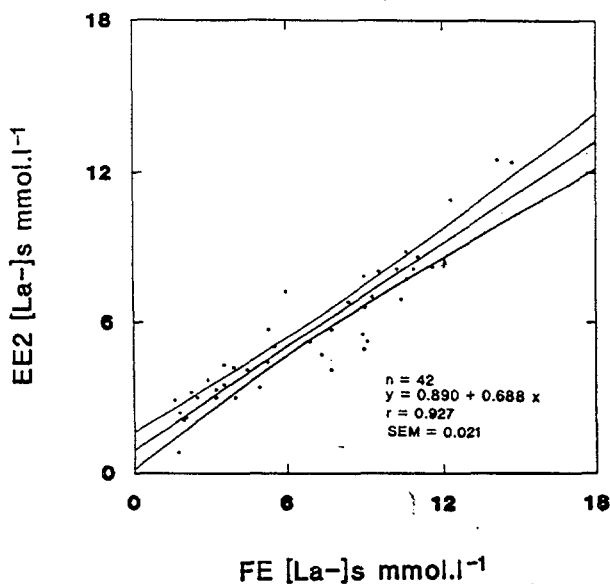


Figura 5. Comparació entre el mètode electroenzimàtic (EE2) i el fotoenzimàtic (FE).

A la gràfica s'indiquen la recta de regressió i els límits de l'interval de confiança del 95%; també es presenten el tamany de la mostra (n), l'equació de regressió, el coeficient de correlació de Pearson (r) i l'error estàndard de la mitja (SEM).

Figura 5. Comparación entre el método electroenzimático (EE2) y el fotoenzimático (FE).

En la gráfica se indican la recta de regresión y los límites del intervalo de confianza del 95%; también se presentan el tamaño muestral (n), la ecuación de regresión, el coeficiente de correlación de Pearson (r), y el error estándar de la media (SEM).

ESTUDIO COMPARATIVO

(EE3)

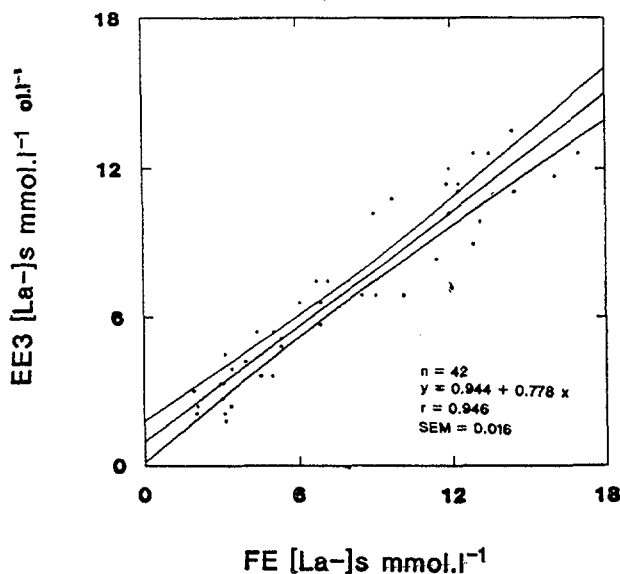


Figura 6. Comparació entre el mètode electroenzimàtic (EE3) i el fotoenzimàtic (FE).

A la gràfica s'indiquen la recta de regressió i els límits de l'interval de confiança del 95%; també es presenten el tamany de la mostra (n), l'equació de regressió, el coeficient de correlació de Pearson (r) i l'error estàndard de la mitja (SEM).

Figura 6. Comparación entre el método electroenzimático (EE3) y el fotoenzimático (FE).

En la gráfica se indican la recta de regresión y los límites del intervalo de confianza del 95%; también se presentan el tamaño muestral (n), la ecuación de regresión, el coeficiente de correlación de Pearson (r), y el error estándar de la media (SEM).

per mesurar lactat sanguini, fa aconsellable triar-lo com a mètode d'elecció. No obstant, per alguns assaigs, on és important la rapidesa en l'obtenció de resultats o la sencillesa de l'assaig, resulta interessant l'ús dels mètodes semiautomàtics (EE). En aquest cas, els valors obtinguts han d'ésser ajustats –estimant la seva equivalència amb valors FE– si és vol utilitzar-los com a referència per a l'entrenament o per al càlcul de paràmetres fisiològics com ara el llindar anaeròbic o de lactat.

Agraïments

Agraïm als Drs. Alois Mader i Ulrich Hartmann llur consell i suport. També agraïm la col·laboració de Boehringer Mannheim Espanya i dels Srs. Freixas i Corsellas per facilitar-nos els patrons de referència i part de l'utilatge. Tantmateix al Sr. Martin (Sodin, S.A., representant de Yellow Springs Instruments Ltd.) i Sr. Fuchs (Mediplan, representant d'Analox Instruments Co.) per facilitar-nos l'instrumental per a l'estudi.

sentamos en la Tabla 2 –predicción de los valores correspondientes a otro método distinto.

Por tanto, concluimos que debe ser tenido en cuenta que no existe equivalencia en los métodos analíticos más utilizados actualmente en los laboratorios de fisiología del ejercicio. La mejor linealidad, buena precisión y especialmente, la mayor validez del método fotoenzimático para medir lactato sanguíneo, hacen aconsejable utilizar dicho método como elección. No obstante, para cierto tipo de ensayos, en que es importante la rapidez en la obtención de resultados o la sencillez del ensayo, resulta interesante el uso de los métodos semiautomáticos (EE). En tal caso, los valores obtenidos deberían ser ajustados –estimando su correspondencia con valores FE– si se pretende utilizarlos como referencia para el entrenamiento o para el cálculo de parámetros fisiológicos tales como el umbral anaeróbico o de lactato.

Agradecimientos

Agradecemos a los Dres. Alois Mader y Ulrich Hartmann su consejo y apoyo. También agradecemos la colaboración de Boehringer Mannheim España y de los Sres. Freixas y Corsellas por facilitarnos los patrones de referencia y parte del utillaje. Asimismo al Sr. Martin (Sodin, S.A., representante de Yellow Springs Instruments Ltd.) y Sr. Fuchs (Mediplan, representante de Analox Instruments Co.) por facilitarnos el instrumental para el estudio.

Bibliografia

1. ANALOX INSTRUMENTS Ltd.: Analox Micro-Stat analyzers. Micro-Stat LM3. London. UK.
2. CLARK, L.C. Jr.; NOYES, L.K.; GROOMS, T.A.; MOORE, M.S.: Rapid micromasurement of lactate in whole blood. *Critical Care Medicine* 12 (5): 461-464, 1984.
3. CLARK, L.C. Jr.: The hydrogen peroxide sensing platinum anode as an analytical enzyme electrode. In: Fleisher, S.; Packer, L. (eds.), *Methods in Enzymology*. vol. 56. pp. 448-479, Academic Press Inc. New York, 1979.
4. DIETZE, A.; DONATH, R.; ROCKSTROH, K.: Vergleichende Untersuchungen der Laktat Konzentrationen in Blutproben aus verschiedenen Entnahmestellen. *Med. u. Sport* 14 (12): 370-479, 1974.
5. HECK, H.; MADER, A.; HESS, G.; MÜCKE, S.; MÜLLER, R.; HOLLMAN, W.: Justification of 4mmol/l lactate treshold. *Int. J. Sports Med.* 6: 117-130, 1985.
6. HECK, H.; HESS, G.; MADER, A.: Vergleichende Untersuchung zu verschiedenen Laktat-Schwellwknzeptem. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, 36 (1): 19-25, 1985.
7. HILL, A.V.; LUPTON, H.: Muscular exercise, lactic acid, and the supply and utilization of oxygen. *Quarterly Journal of medicine* Jan, 135-171, 1923.
8. HOLLMAN, W.: Historical remarks on the development of the aerobic-anaerobic threshold up to 1966. *Int. J. Sports. Med.* 6: 109-116, 1985.
9. HOLLMAN, W.; MADER, A.; HECK, H.; LIESEN, H.; OLBRECHT, J.: Laktatdiagnostik – Die Entwicklung und praktische Bedeutung in der Sportmedizin und Klinischen Leistungsdiagnostik. *Medizintechnik* 105, 5: 154-162, 1985.
10. JACOBS, I.; SJÖDIN, B.; KAISER, P.; KARLSSON, J.: Onset of blood lactate accumulation after prolonged

- exercise. *Acta Physiol, Scand* 114: 461, 1981.
11. KARLSSON, J.; JACOBS, I.: Onset of blood lactate accumulation during muscular exercise as a threshold concept in a new illumination. *Int. J. Sports Med.* 3(4): 190-201, 1982.
 12. KARLSSON, J.; JACOBS, I.; SJÖDIN, B.; TESCH, P.; KAISER, P.; SAHL, O.; KARLBERG, B.: Semi-automatic blood lactate assay: Experiences from an exercise laboratory. *Int. J. Sports Med.* 4:52-55, 1983.
 13. MADER, A.; LIESEN, H.; HECK, H.; PHILIPPI, A.; ROST, R.; SCHÜRCH, P.; HOLLMANN, W.: Zur Beurteilung der sportartspezifischen Ausdauerleistungsfähigkeit im Labor. *Sportarzt Sportmed* 4:80-88; 5: 109-112, 1976.
 14. MADER, A.; HECK, H.; HOLLMANN, W.: Evaluation of lactic acid anaerobic contribution by determination of postexercise lactic acid concentration of ear capillary blood in middle-distance runners and swimmers. In: *Exercise Physiology, Book 4, The International Congress of Physical Activity Sciences*, 1976, Quebec, Canada; Miami, USA., 1978, pp. 187-200.
 15. MADER, A.; HECK, H.; FÖHRENBACH, R.; HOLLMANN, W.: Das statische und dynamische Verhalten des Laktats und des Säure-Base-Status im Bereich niedriger bei maximaler Azidosen bei 400-m und 800-m-Läufern bei beiden Geschlechtern nach Belastungsabbruch. *Dtsch Z Sportmed*, 30 (7): 203-211, (8): 249-261, 1979.
 16. MADER, A.; HECK, H.: A theory of the metabolic origin of "anaerobic threshold". *Int. J. Sports Med.* (suppl.) 7:45-65, 1986.
 17. MÄTTNER, U. (ed.): Lactate in sports medicine. Boehringer Mannheim GmbH., Diagnostics Division. Mannheim, RFA, 1988.
 18. NOLL, F.: L-(+)-Lactate. Determination with LDH, GPT and NAD. In: H.U. Bergmeyer, *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd. ed. (Methoden der enzymatischen Analyse, 3rd. ed. vol. II, Verlag Chemie, Weinheim/RFA), Academic Press, Inc. New York and London, 1974.
 19. OLBRECHT, J.; MADSEN, O.; MADER, A.; LIESEN, H.; HOLLMANN, W.: Relationship between swimming velocity and lactic acid concentration during continuous and intermittent training exercises. *Int. J. Sports Med.* 6:74-77, 1985.
 20. RODRÍGUEZ, F.A.: Umbral anaeróbico y entrenamiento. *Archivos de Medicina del Deporte.* 3(10): 145-156, 1986.
 21. RODRÍGUEZ, F.A., MARTÍN, R.: Análisis de la transición anaeróbica aláctico-láctica en velocistas mediante un test de lactacidemia. *Proceedings, V European Congress of Sports Medicine*, Barcelona, 1988.
 22. RODRÍGUEZ, F.A.: Valoración funcional y perfil fisiológico de remeros de nivel internacional. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona. Barcelona, 1989.
 23. RYDEVICK, U.; NORD, L.; INGMAN, F.: Automatic lactate determination by flow injection analysis. *Int. J. Sports Med.* 3: 37-49, 1982.
 24. SCHWAB, W.; TRITSCHLER, W.; KESSLER, A.CH.; BABLOK W.: Neue enzymatische Lactatbestimmung: Methodische Aspekte und Probengewinnung. *J. Clin. Chem Clin. Biochem.* 17,2: 65-70, 1979.
 25. WASSERMANN, K.; MCILROY, M.B.: Detecting the threshold of anaerobic metabolism in cardiac patients during exercise. *Am. J. Cardiol.* 14: 844-852, 1964.
 26. YELLOW SPRINGS INSTRUMENTS CO.: YSI Model 23L Lactate analyzer instruction manual. Scientific Division, Yellow Springs Instrument Co. Inc. Yellow Springs, Ohio, 1984.