

Aplicación de las cartas simples de control en el laboratorio antidoping

Dayamín Martínez Brito, Margarita Teresa Correa Vidal y Roberto Oropesa Rodríguez.

Instituto de Medicina del Deporte, Laboratorio Antidoping, Departamento Analítico, Calle 100 y Aldabó, Ciudad de La Habana, Código Postal 10800, Cuba. Correo electrónico: antidop@inder.cu

Recibido: 17 de julio de 2006. Aceptado: 21 de mayo de 2007.

Palabras clave: control de la calidad, gráficas de Shewhart, cartas simples de control, control antidopaje.
Key words: quality control, Shewhart charts, simple control chart, antidoping control.

RESUMEN. Las cartas de control son métodos muy utilizados en los laboratorios de ensayo para realizar el control interno del procesamiento analítico de las muestras. Son representaciones gráficas de datos de acuerdo con determinadas reglas de construcción que permiten; entre otras cosas, demostrar el estado del control estadístico del sistema analítico, realizar el seguimiento de un proceso de medición, aportar información sobre aspectos críticos del muestreo y tener un control de la reproducibilidad y repetibilidad del análisis. El presente trabajo muestra de manera sencilla la aplicación de las cartas simples de control, específicamente las gráficas de Shewhart en el control interno de la calidad del laboratorio antidoping. A partir de la observación de una disminución del rendimiento de extracción o recobrado de la androsterona en el procedimiento extractivo para la detección de esteroides anabólicos y otros compuestos, se llevó a cabo un conjunto de ensayos que constituyeron el análisis de causas. Los resultados indicaron una pérdida de la actividad de la enzima β -glucuronidasa empleada en el procedimiento extractivo. Las pruebas encaminadas en este sentido incluyeron la utilización de una disolución de etiocolanolona-glucurónido, cuyos datos fueron referidos a la aparición del sustrato libre del grupo glucurónido. En segundo lugar, fue empleada una enzima de referencia con iguales características. Los resultados del estudio confirmaron la pérdida de la actividad de la enzima β -glucuronidasa (*E. coli*) empleada en la detección de esteroides anabólicos y otros compuestos en el laboratorio. Este ensayo facilitó en gran medida, la toma de decisiones en este sentido y agilizó la búsqueda de soluciones ante un problema tan delicado como la pérdida de actividad de la enzima empleada en este método extractivo. Los resultados demostraron una vez más, la importancia y utilidad de las cartas simples en el control de la calidad de un laboratorio de ensayo.

ABSTRACT. Control charts are the methods used in any assay laboratory to carry out the internal control of the analytic processing of samples. They are graphic representations of data according to certain construction rules that allow, among others, to demonstrate the statistical control state of the analytical system, to carry out the pursuit of a measuring process, to document critical aspects of the sampling and having a control of the reproducibility and repeatability of the analysis. The present paper shows, in a simple way, the application of control charts, specifically the graphs of Shewhart in the internal quality control system of the antidoping laboratory. Beginning from the observation of an extraction yield decreasing or the recovery of the androsterone in the usual extractive procedure for the detection of anabolic steroids and other compounds, a series of assays were carried out to analyze the analysis of causes. The results indicated a loss of the activity of the enzyme β -glucuronidase used in the extractive procedure. The tests guided in this sense included the use of an etiocholanolone-glucuronide solution, where data were referred to the appearance of the substrate free of the group glucuronide. In second place a reference enzyme with the same characteristics was employed. Data obtained in the study confirmed the loss of the activity of the enzyme β -glucuronidase (*E. coli*) used in the detection of anabolic steroids and other compounds in the laboratory. This assay facilitated in great measure the taking of decisions in this sense and it speeded up the search of solutions

before such a delicate problem as the loss of activity of the enzyme used in this extractive method. The results demonstrate once again, the importance and utility of the control charts in the quality control of an assay laboratory.

INTRODUCCIÓN

Los resultados obtenidos de la aplicación de los métodos analíticos en un laboratorio imponen una gran responsabilidad debido a las implicaciones que traen aparejados. Por ello, estos resultados deben ser muy confiables, pero si se tiene en cuenta que los análisis están sometidos a múltiples fuentes de error (tanto evitables como inevitables), entonces no basta con trabajar con máximo cuidado sino que cada laboratorio necesita un sistema bien establecido y organizado para controlar permanentemente la precisión y exactitud de sus análisis de manera objetiva.¹

Las cartas de control son el método más utilizado en cualquier laboratorio de análisis para realizar el control interno del procesamiento de las muestras; son representaciones gráficas de datos de acuerdo con determinadas reglas de construcción que permiten:

- demostrar el estado del control estadístico del sistema analítico,
- realizar el seguimiento de un proceso de medición,
- diagnosticar problemas de la medición,
- aportar información sobre la incertidumbre de los resultados,
- aportar información sobre aspectos críticos del muestreo y

- tener un control de la reproducibilidad y repetibilidad del análisis.¹⁻⁵

Existen diferentes cartas de control entre las que se encuentran las de Shewhart (1925) con una mayor aplicación en estudios de recobrados y precisión y las Cusum (1950) fundamentalmente aplicadas a estudios de tendencias.² Los principios de construcción generales son los mismos para ellas. Se utiliza una población normal (que sigue una distribución Gaussiana) y los estimados experimentales son la media y la desviación estándar.

Para evaluar la reproducibilidad de un método de extracción es necesario tener un control negativo o positivo preparado partiendo de materiales de referencia; el control seleccionado es analizado durante 20 d consecutivos y con este cúmulo de datos se construye la gráfica de control. Los errores groseros en el conjunto de datos son eliminados mediante un procesamiento estadístico. Los resultados de los análisis de los controles tienen una fluctuación permisible (error por azar), tal vez normal. Tan pronto pasen de este intervalo, hay que sospechar una desviación sistemática (error grosero). Las fluctuaciones por azar siguen una distribución normal (Gaussiana) y por tanto, tienen que mantenerse dentro de los límites de esta.¹⁻⁵

Como parte del control interno de la calidad en el procesamiento extractivo de muestras, el laboratorio de los autores utiliza las gráficas de Shewhart, con lo que se controla la calidad del proceso a cada lote analítico. En el procedimiento diseñado para la detección e identificación de esteroides anabólicos excretados en forma libre y conjugada, se emplea un control negativo el cual es caracterizado previamente. Las gráficas de Shewhart son confeccionadas con las concentraciones estimadas de testosterona, epitestosterona, androsterona y etiolanolona libres del grupo glucurónido del control negativo. Con ello, se controla de forma eficiente el procedimiento extractivo que consta de una extracción en fase sólida, hidrólisis enzimática, extracción líquido-líquido y la formación de derivados trimetilsilil (TMS).

El presente trabajo describe la aplicación de las cartas simples de control, específicamente las gráficas de Shewhart en el control interno de la calidad del procesamiento de muestras en el Laboratorio Antidoping

para la detección e identificación de esteroides anabólicos y otros compuestos excretados en forma libre y conjugada en la orina humana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

β -Glucuronidasa, tipo IX-A *E coli* (Sigma, Alemania); β -glucuronidasa, tipo K12 *E coli* (enzima de referencia, Roche, Alemania); carbonato de potasio (Sigma-Aldrich, Alemania); dihidrógenofosfato de sodio anhidro y monohidratado (Merck, Alemania); metanol, pureza 99,93 % (Sigma, Alemania); *tert*-butilmetiléter, pureza 99,8 % (Sigma, Alemania); *N*-metil-*N*-trimetilsililtrifluoroacetamida para CG (MSTFA), (Sigma, Alemania); ioduro de amonio, pureza 100,7 % (Sigma, Chemical, Alemania); 2-mercaptoetanol (Merck, Alemania); columnas de extracción en fase sólida Detectabuse™ (Biochemical Diagnostics, EE. UU.). Los patrones de referencia de androsterona y etiolanolona fueron proporcionados por el Instituto Municipal de Investigaciones Médicas (Barcelona, España).

Equipos

Vortex mixer M-63210-33 (Thermolyne, EE. UU.); zaranda 260300F (Boekel, EE. UU.); centrífuga (Fisher Scientific, EE. UU.); bomba de vacío 400-1901 (Barnant, EE. UU.); termostato seco de 36 plazas (Pierce, EE. UU.); baño con termostato GP-100 (Neslab, EE. UU.); procesador de extracción sólido-líquido (Supelco, EE. UU.); cromatógrafo de gases HP 6890 acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolar HP 5973, con inyector automático serie 7683 y computadora HP Vectra VL, (Hewlett Packard, EE. UU.).

Métodos

Se realiza extracción en fase sólida mediante el uso de una columna Detectabuse™, previamente activadas con 2 mL de metanol y 2 mL con agua desionizada, el lavado se realiza con 2 mL de agua desionizada y los compuestos adsorbidos en la columna son eluidos con 2 mL de metanol. El disolvente es evaporado a sequedad y el extracto es reconstituido con 1 mL de disolución reguladora de fosfato pH = 7. La hidrólisis se realiza con β -glucuronidasa (*E. coli*) durante 1 h a 55 °C. Le sigue una extracción líquido-líquido con *tert*-butilmetiléter luego de alcanzar un pH elevado entre 9 y 10 con 250 μ L de una disolución de K₂CO₃ 5 %. La reacción para la formación de deri-

vados trimetilsilil se realiza con una mezcla MSTFA- NH₄I- 2-mercaptoetanol (v/m/v) (1 000 : 0,2 : 0,6).⁶⁻⁸

Condiciones cromatográficas

Columna capilar HP-1 (Agilent Technologies, EE. UU.); metilsiloxano, 16,5 m; d.i. 0,20 mm; grosor de la fase estacionaria 0,11 μ m; inyector a 280 °C, modo de inyección: split (relación 10 : 1); flujo purga septum: 2,7 mL/min; volumen de inyección: 2 μ L; gas portador: helio (0,9 mL/min, flujo constante); programa de temperatura: 180 °C, incrementar a 235 °C con una rampa de 3 °C/min, incrementar hasta 310 °C con una rampa de 40 °C/min. Tiempo final de 3 min. Tiempo total de corrida: 23,21 min. El espectrómetro de masas fue operado en el modo de *monitoreo* selectivo de iones (SIM) con un voltaje de ionización de 70 eV, fuente iónica a 230 °C, interface a 280 °C, cuadrupolo a 150 °C. La identificación de los compuestos se realiza por comparación del espectro de masas y el tiempo de retención de los compuestos con un patrón de referencia. La cuantificación de los compuestos en la orina se lleva a cabo mediante el método del patrón interno con factor de respuesta másico.

Confección de la gráfica de Shewhart para el control negativo

El primer paso para la obtención del control negativo en el procedimiento de detección e identificación de esteroides anabólicos excretados en forma libre y conjugada en orina es la recolección de 1 000 mL de orina de un individuo supuestamente sano que no haya ingerido ningún tipo de medicamento incluido en el listado de sustancias prohibidas por el Comité Olímpico Internacional (COI) o alguna sustancia que pudiera interferir cromatográficamente en el ensayo. El segundo paso, es la caracterización de esta orina; para ello, se procesan 20 alícuotas de 2,5 mL analizadas en días diferentes. Son determinadas la media y la desviación estándar para las concentraciones de testosterona, epitestosterona, androsterona y etiolanolona libres en la orina, una vez que pierden su enlace con el grupo glucurónido mediante el proceso de hidrólisis enzimática por acción de la enzima β -glucuronidasa (Fig. 1).

La eliminación de errores groseros se realiza mediante el método de las cuatro desviaciones estándar ($\alpha = 0,05$) para un intervalo de confianza del 95 %. La gráfica de control se construye con los valores de la me-

día \pm 2 y tres veces la desviación estándar.

La androsterona y etiolanolona (epímeros en C₃) son los principales metabolitos de la testosterona y son excretados en concentraciones muy superiores a esta. Cuando la concentración y actividad de la enzima es insuficiente, el rendimiento de extracción de estos compuestos es afectado en gran medida.

Uso diario de la gráfica de Shewhart

Las concentraciones de cada uno de los compuestos en el control negativo procesado en cada lote analítico es verificado diariamente en esta gráfica, facilitando y garantizando el control de la calidad del lote analítico.

En el control interno diario comenzó a observarse un comportamiento anómalo de las concentraciones de androsterona y la etiolanolona en el control negativo, lo cual indica que los valores ya no siguen una distribución normal, pues se van más allá de los límites de esta. No obstante, haberse observado el mismo comportamiento para estos isómeros, sólo se expone como ejemplo, uno de ellos. Ante este problema, se hizo necesaria la verificación de cada uno de los reactivos y disoluciones empleados en el procesamiento de las muestras (disolución carbonato de potasio 5 %, disoluciones reguladoras de fosfato 75 mmol pH = 6,8 y 7) y se emplearon nuevos lotes de disolventes (metanol y *tert*-butilmetiléter).

Para la verificación de la actividad de la enzima fueron extraídas alícuotas con volúmenes crecientes de enzima partiendo de una disolución acuosa de etiolanolona-glucurónido en concentraciones similares a las encontradas en el control negativo de referencia. Posteriormente, se realizó una comparación de la actividad enzimática empleando otra enzima de referencia. Todas las muestras analizadas (incluida la disolución acuosa de etiolanolona-

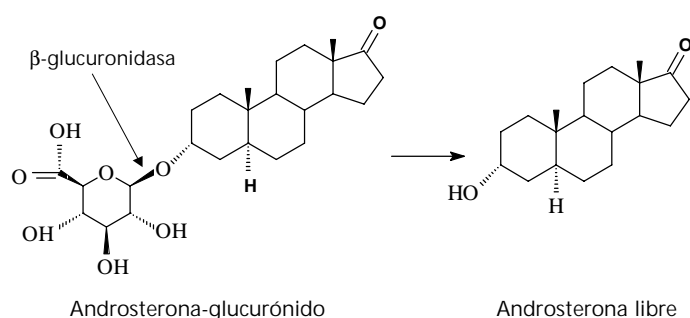


Fig. 1. Acción de la enzima en la posición 3 β de la molécula de androsterona-glucurónido.

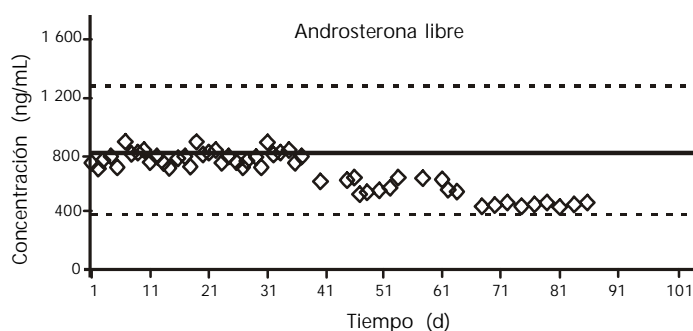


Fig. 2. Gráfica de Shewhart para el recobrado de la androsterona en el control negativo en cada lote analítico.

lona-glucurónido) fueron procesadas según se explica en Materiales y Métodos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Uno de los pasos de mayor importancia dentro del procesamiento extractivo de esteroides anabólicos excretados en forma conjugada es la hidrólisis enzimática, debido a que los esteroides anabólicos, ya sean endógenos o exógenos, se excretan en forma de glucurónidos. Por tanto, se hace necesaria la separación del grupo glucurónido de la molécula mediante una hidrólisis a nivel de la posición β del carbono 3 para su análisis instrumental. Varios son los factores que influyen en la eficiencia de la hidrólisis a saber: temperatura, tiempo de incubación, cantidad de sustrato y concentración y actividad de la enzima en las muestras. En su conjunto, influyen en el recobrado o rendimiento de extracción de todos los compuestos a extraer de la matriz. Todos estos factores que determinan la eficiencia de la hidrólisis enzimática pueden ser controlados con el uso de las cartas simples de control.

El comportamiento diario del recobrado o rendimiento de extracción de la androsterona libre en el control negativo reveló que a partir del día 31 las concentraciones absolutas de la androsterona libre comenzaron a alejarse de su valor

medio y se observaron bajos recobrados (Fig. 2).

En la evaluación de los resultados del análisis de los controles negativos que fueron procesados con disoluciones nuevamente preparadas y disolventes que correspondían a lotes diferentes, se observaron los mismos resultados: concentraciones de androsterona muy por debajo de los valores esperados según la gráfica de Shewhart (entre 372,0 y 1 270,0 ng/mL). No se observó mejoría del recobrado de la androsterona libre en el control negativo.

Para la verificación de la actividad de la enzima fueron extraídas muestras a diferentes concentraciones de etiolanolona-glucurónido con volúmenes crecientes de la enzima liofilizada. Con los resultados se conformó una curva de calibración con cinco puntos de 130, 150, 170, 200 y 230 μ L (volúmenes adicionados de enzima reconstituida) por muestra, lo cual fue equivalente a 108,3, 125,0, 141,6, 166,6 y 191,6 UI/muestra (Fig. 3). Para la obtención de la curva fueron graficados el volumen de enzima adicionada y la relación de áreas entre el patrón interno utilizado (17 α -metiltestosterona) y la etiolanolona libre del grupo glucurónido. Las áreas fueron obtenidas por la integración de los iones a *m/z* 446 para el patrón y *m/z* 434 para la etiolanolona libre. Pudo observarse, que a pesar de los volúmenes de enzima utilizados, no se obtuvieron relaciones de área constantes que pudieran indicar el paso completo de etiolanolona-glucurónido a etiolanolona libre independientemente del volumen de enzima adicionado.

Comparación de la actividad de la enzima existente en el laboratorio y una enzima β -glucuronidasa de referencia

Posteriormente, se comparó la actividad enzimática obtenida con volúmenes crecientes de la enzima

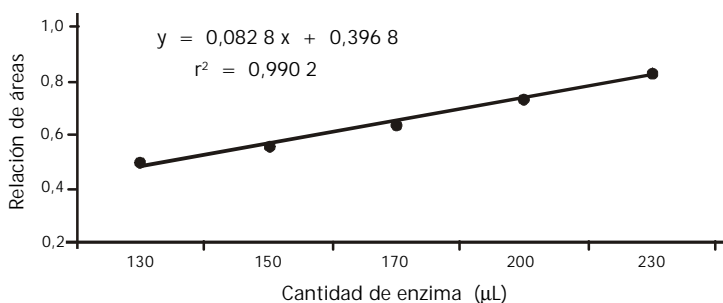


Fig. 3. Relación entre volumen de enzima adicionada y etiocolanolona libre.

reconstituida existente en el laboratorio con una enzima de referencia en el mismo control negativo. Los resultados fueron graficados relacionando las concentraciones de androsterona obtenida en el control negativo y la cantidad de enzima adicionada (Fig. 4). La media de las concentraciones de androsterona obtenidas con la enzima de referencia (30 µL de enzima equivalente a 250 UI/muestra) fue de 2 761,1 ng/mL; valor que no fue alcanzado con los volúmenes crecientes de enzima adicionados al control negativo.

Los resultados obtenidos en esa comparación demostraron que la enzima liofilizada no se encontraba apta para ser utilizada en el procedimiento de extracción de muestras de orina para la detección de esteroides anabólicos en el laboratorio antidoping.

CONCLUSIONES

La aplicación de las gráficas de Shewhart en el control interno de la calidad del método analítico para la detección de esteroides anabólicos demostró ser útil y eficiente. El uso diario de estas cartas de control permitió determinar la disminución de la actividad de la enzima empleada en el ensayo aún cuando no había

llegado su fecha de caducidad y su conservación era adecuada. Este método para realizar el control interno de la calidad es aplicable a cualquier método analítico y también a cualquier laboratorio de ensayo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Aristides Rosado Pérez por su participación en la revisión del trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Thielman K. Principios de Metodología en Bioquímica Clínica. Capítulo 5, Primera Ed. Editorial Organismos, Instituto Cubano del Libro, 77-83, 1973.

2. Maravelakis P. An Investigation of Some Characteristics of Univariate and Multivariate Control Charts, <http://www.stat-athens.aueb.gr>. (Consultado: 10 de febrero de 2006.)

3. Clemson University. Statistical Quality Control on line. Control Charts. <http://www.sqconline.com>, 2000-2001. (Consultado: 10 de febrero de 2006.)

4. Clemson University. Quality Control Charts, <http://www.statsoft.com>, 2003. (Consultado: 10 de febrero de 2006.)

5. Clemson University. Control Charts as a tool in SQC (Statistical Quality Control), <http://deming.eng.clemson.edu>. (Consultado: 10 de febrero de 2006.)

6. De la Torre X., Pascual J.A., Ortuño J. and Segura J. Testosterone detection in different ethnic group, **Recent advances in doping analysis**, 4, 71, 1997.

7. De la Torre X., Ortuño J., Cabrer J. and Vilardell E. Stanazolol, Methenolone and steroid profile, **Recent advances in doping analysis**, 1, 69, 1994.

8. Geyer H., Shaenzer W. and Mareck-Engelke U. Screening Procedure for Anabolic steroids. The control of the hydrolysis with deuterated Androsterone glucuronide and studies with direct hydrolysis, **Recent advances in doping analysis**, 5, 99, 1998.

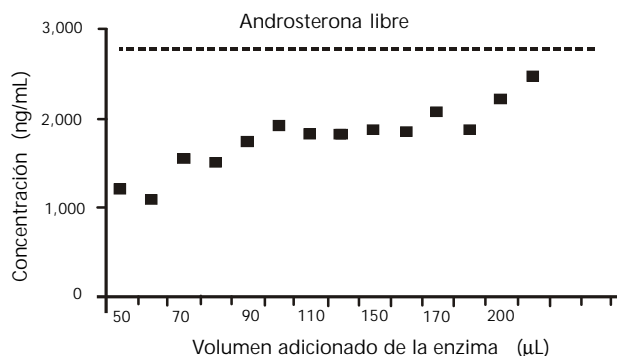


Fig. 4. Relación de androsterona libre en el control negativo y la cantidad de enzima adicionada.



RESULTADOS CIENTIFICOS DESTACADOS MINISTERIO DE EDUCACION SUPERIOR DE CUBA

APLICACIÓN DE TÉCNICAS BIOTECNOLÓGICAS PARA EL RESCATE DE ESPECIES EN PELIGRO DE EXTINCIÓN

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central de las Villas "Marta Abreu"

Se desarrolló una metodología para la micropropagación *in vitro* de tres especies catáceas que posibilitó la multiplicación masiva de tres especies de cactus que habitan en la manigua costera y en los cerros de Pelo Malo y Agabama en Cuba: *Pilosocereus robinii*, *Pilosocereus* sp. y *Melocactus actina canthus*. La novedad del trabajo radicó en que por primera vez se trabajó *in vitro* con estas especies endémicas y en la utilización de una nueva estrategia para la aplicación de la biotecnología en la conservación de especies, cuyo objetivo principal es garantizar la producción de la cantidad de individuos necesarios para restaurar el ecosistema degradado.