

Adaptación del procedimiento de medida de seis magnitudes del metabolismo intermediario al autoanalizador Viva Vitalab®

A. Latorre Ibarra¹, P. Gómez González¹, P. Díaz-Rubio García¹, A. García Lerma¹, E. González Vioque¹, M. Guardia Lluch²

RESUMEN

Las concentraciones sanguíneas de marcadores bioquímicos del metabolismo intermediario son un reflejo del estado del metabolismo energético de nuestro organismo, por lo cual los laboratorios clínicos deberían ofrecer métodos rápidos y fiables para su determinación. En nuestro laboratorio hemos realizado una adaptación de la medición de seis magnitudes del metabolismo intermediario (lactato, ácidos grasos no esterificados, β -hidroxibutirato, piruvato, acetoacetato y glucosa) en un analizador Viva Vitalab® (Dade Behring), así como la evaluación de dichos procedimientos y un estudio de correlación con los métodos utilizados anteriormente en nuestro laboratorio.

Los coeficientes de variación intra e interserie oscilaron entre 0,30 % (ácidos grasos no esterificados) y 11,22 % (acetoacetato). Los estudios de detectabilidad y linealidad mostraron resultados satisfactorios.

El estudio de correlación entre procedimientos fue satisfactorio para el β -hidroxibutirato, ácidos grasos no esterificados, acetoacetato y glucosa, detectándose un error proporcional en el lactato y piruvato y constante en el piruvato.

A la vista de estos resultados, podemos concluir que la adaptación de la medición de estas seis magnitudes al autoanalizador Viva Vitalab® muestra una buena precisión, detectabilidad y exactitud, por lo que resulta muy practicable para la rutina de un laboratorio de análisis.

Palabras clave: Lactato, ácidos grasos no esterificados, β -hidroxibutirato, piruvato y acetoacetato.

SUMMARY Measurement of six intermediate metabolites adapted on the Viva Vitalab® analyzer

Blood concentrations of biochemical markers involved in intermediate metabolism are an expression of energy metabolic status; clinical laboratories should offer their measurement by reliable and rapid procedures. In our laboratory, we have evaluated six intermediate metabolism magnitudes (lactate, pyruvate, acetoacetate, β -hydroxybutyrate, non-esterified fatty acids and glucose) adapted to a Viva Vitalab® analyzer (Dade Behring), and compared these procedures with previously well-known methods.

Within-run and between-run imprecision ranged from 0.30% (non esterified fatty acids) to 11,22 % (acetoacetate). Detectability and linearity were acceptable.

The correlation study between procedures was satisfactory for β -hydroxybutyrate, non-esterified fatty acids, acetoacetate and glucose, but proportional errors were detected for lactate and pyruvate and constant errors for pyruvate.

We conclude that the automation of these six magnitudes on the Viva Vitalab® analyzer yields precision, accuracy and good detectability, thus showing to be practicable as routine techniques in the clinical laboratory.

Key words: Lactate, non-esterified fatty acids, β -hydroxybutyrate, pyruvate and acetoacetate.

INTRODUCCIÓN

Las concentraciones sanguíneas de determinados marcadores bioquímicos del metabolismo intermediario ofrecen información acerca de la situación del estado del metabolismo energético de nuestro organismo. La determinación simultánea de lactato, piruvato, β -hidroxibutirato (β OHB) y acetoacetato (AcAc) puede utilizarse como indicador de homeostasis (1). El lactato ha sido utilizado tradicionalmente como indicador de hipoxia o de acidosis láctica debidas a disminución de perfusión o aumento de producción de lactato (2). Sin embargo, la determinación aislada de lactato no proporciona una información real del estado bioenergético en los diferentes tejidos (3), por lo que se utiliza el cociente lactato/piruvato, que refleja su

estado de oxidación (4), mientras que el cociente β OHB/AcAc nos informa sobre el estado redox intramitocondrial (5).

Por otra parte, tanto el lactato como el piruvato son utilizados en la práctica diaria, para el diagnóstico de las encefalopatías mitocondriales congénitas o adquiridas (6).

El β OHB y AcAc son los dos principales cuerpos cetónicos del organismo y la elevación de sus concentraciones plasmáticas es debida, en la mayoría de las veces, a un aumento de la β -oxidación de ácidos grasos (7); de ahí también la importancia de la determinación de los ácidos grasos no esterificados (AGNE). Estas magnitudes se elevan en diabetes mellitus no controladas, intoxicaciones por etanol o salicilato y también en errores congénitos del metabolismo (7). En ocasiones puede existir un aumento del cociente β OHB/AcAc, con o sin cetosis, que es reflejo de una alteración del estado redox mitocondrial debido a hipoxia, isquemia, desórdenes del metabolismo o fallo multiorgánico (7).

¹ Servicio de Bioquímica. Hospital Universitario «12 de Octubre». Ctra. de Andalucía Km 5,4. 28041 Madrid. ² Dade Behring, S.A.

Por todo ello, es de suma importancia la determinación conjunta de todos estos metabolitos intermediarios, junto con la glucosa, para obtener una información lo más completa posible acerca del estado metabólico del organismo, y el laboratorio debe ofrecer al clínico unos resultados rápidos, fiables y precisos en aquellos casos en los que sea necesario un diagnóstico precoz.

El objetivo de este trabajo es la adaptación de la medición de estas seis magnitudes del metabolismo intermediario (lactato, ácidos grasos no esterificados, β -hidroxibutirato, piruvato, acetoacetato y glucosa) en un analizador Viva Vitalab® (Dade Behring), así como la evaluación de dichos procedimientos y un estudio de correlación con los utilizados anteriormente en nuestro laboratorio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos

– Lactato. Método enzimático (lactato oxidasa-peroxidasa) (8). *Lactato PAP*, BioMérieux. 61 192 (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia).

– Ácidos grasos no esterificados. Método enzimático (9). *NEFA C, ACS-ACOD method*, WAKO 994-75409 (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Alemania).

– β -hidroxibutirato. Método enzimático (10). *β -Hydroxybutyrate*, Sigma Diagnostics® 310-UV (Sigma Diagnostics®, St Louis, USA).

– Piruvato. Adaptación de un método enzimático (11). *Pyruvate*, Sigma Diagnostics® 726-UV (Sigma Diagnostics®, St Louis, USA).

– Acetoacetato. Adaptación de un método enzimático (11). El sustrato NADH es el mismo que en el piruvato. La enzima β -hidroxibutirato deshidrogenasa fue suministrada por Roche, *β -hydroxybutyrate dehydrogenase*, Roche. 127 841 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania).

– Glucosa. Método enzimático (glucosa oxidasa-peroxidasa) (12). *Glucosa Auto Plus®* 765100 (Izasa, Barcelona, España).

Calibradores y controles

– *Calibradores*

– Lactato. Calibrador cero: solución de cloruro sódico (9g/L). Calibrador uno: reactivo 1 del equipo de reactivos.

– Ácidos grasos no esterificados. Calibrador cero: solución de cloruro sódico (9g/L). Calibrador uno: *NEFA standard solution* incluida en el equipo de reactivos.

– β -hidroxibutirato. Calibrador cero: solución de cloruro sódico (9g/L). Calibrador uno: *β -HBA calibrator solution* del equipo de reactivos diluida al 1:10 con agua destilada.

– Piruvato. *Pyruvic acid standard solution* incluida en el equipo de reactivos.

– Acetoacetato. *Acetoacetic acid (lithium salt)* 0,1 mmol/L. Sigma A-8509.

– Glucosa. *Calibrator for automated systems*, Roche 759350.

– *Controles*

– Lactato. Control con valores dentro del intervalo de referencia (CN): *Sigma metabolite control normal*. Sigma S-3006. Control con valores fuera del intervalo de referencia (CE): *Sigma metabolite control elevated*. Sigma S-3005.

– Ácidos grasos no esterificados. Control CN: se utilizó el calibrador uno diluido 1:1 con agua destilada. Control CE: se utilizó la solución estándar.

– β -hidroxibutirato. Control β -OHB normal de Sigma H2511. Para el control CN se diluyó al 1:10 y para el control CE al 1:2 con agua destilada.

– Piruvato. Control CN: *Sigma metabolite control normal*. Control CE: *Sigma metabolite control elevated*.

– Acetoacetato. Controles obtenidos a partir de *Acetoacetic acid (lithium salt)* Sigma A-8509 diluidos con agua destilada.

– Glucosa. Control CN: *Precinorm U*. Roche Ref 651257. Control CE: *Precipath U*. Roche 651265.

Los valores de calibradores y controles están representados en la tabla I.

Preparación de las muestras

Para las determinaciones de lactato, AGNE, β -OHB y glucosa, las muestras fueron extraídas con EDTA tripotásico. Con el fin de parar la glucólisis, se añadió una gota de fluoruro potásico (*potassium fluoride*, Sigma P-6642, al 10%) por mL de sangre, y el plasma se separó inmediatamente previa centrifugación a 2500 r.p.m. durante 10 minutos. Los AGNE y el β -OHB no necesitan el fluoruro, pero su presencia no afecta a su determinación, por lo que se utilizó la misma muestra.

Tabla I. Características técnicas para cada una de las magnitudes en el Viva Vitalab®.

	Lactato	AGNE	β -OHB	Piruvato	AcAc	Glucosa
Modo	Punto final	2 puntos	2 puntos	2 puntos	2 puntos	Punto final
λ (nm)	505-578	546	340	340	340	505-620
Volumen reactivo (μ L)	R1: 300	R1: 110 R2: 180	R1: 323 R2: 65	R1: 250 R2: 20	R1: 220 R2: 40	R1: 396
Volumen muestra (μ L)	3	5	7	30	30	6
Blanco de Reactivo	–	–	–	–	H ₂ O destilada	–
Calibrador 0	Solución de cloruro sódico (9 g/L)	Solución de cloruro sódico (9 g/L)	Solución de cloruro sódico (9 g/L)	–	–	Solución de cloruro sódico (9 g/L)
Calibrador 1 (mmol/L)	3,00	1,00	0,48	0,45	0,10	10,10
Control N (mmol/L)	0,80	0,50	0,06	0,07	0,10	5,57
Control E (mmol/L)	2,30	1,00	0,29	0,20	0,25	13,80
Tiempo de Incubación	4,5 min	8, 344 seg	–19, 344 seg	–19, 291 seg	–19, 317 seg	4,5 min
Temperatura	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C

AGNE: ácidos grasos no esterificados; β -OHB: β -hidroxibutirato; AcAc: acetoacetato.

Control N: Control con valores dentro del intervalo de referencia; Control E: Control con valores fuera del intervalo de referencia.

Para las determinaciones de Piruvato y AcAc, se utilizó sangre con EDTA. Las muestras fueron desproteinizadas inmediatamente mezclando sangre y ácido perclórico al 8% a partes iguales. Se agitó bien, se mantuvo en hielo diez minutos y se centrifugó dos veces durante 10 min a 3000 r.p.m. para obtener un sobrenadante claro. Los calibradores y controles se desproteinizaron como las muestras.

Características técnicas

El instrumento utilizado fue el Viva Vitalab®, Dade Behring (Syva Company, Dade Behring Inc, Cupertino, CA 95014, USA)

La tabla I resume las características técnicas para cada una de las magnitudes.

Todos los reactivos se prepararon siguiendo las indicaciones del fabricante, excepto en el caso del piruvato y AcAc.

– Piruvato. Reactivo 1: diluir un vial de NADH con 10 mL de *Trizma base solution*. Reactivo 2: diluir la enzima *lactate dehydrogenase* a 1:3 con *Trizma base solution*.

– Acetoacetato Reactivo 1: el mismo del piruvato. Reactivo 2: diluir la enzima *β-hidroxybutirate dehidrogenase* (Roche) a 1:3 con *Trizma base solution*

Protocolo de evaluación

– Estudio de imprecisión: Para el estudio de la imprecisión se utilizaron dos controles con valores dentro y fuera del intervalo de referencia. Se analizaron por duplicado, durante 10 días y dos series cada día siguiendo las normas del *National Committee for the Clinical Laboratory Standards (NCCLS)* (13).

– Límite de detección: Se analizaron 4 series de 10 replicas del blanco (solución de cloruro sódico [9 g/L]). El límite de detección fue expresado como 3 desviaciones típicas por encima de la media de las cuatro series.

– Linealidad: Se estudió efectuando 10 diluciones de una solución basal para cada una de las magnitudes. Las concentraciones basales de cada magnitud están representadas en la tabla IV.

– Estudio de correlación entre procedimientos: Se han analizado 40 muestras de pacientes pediátricos, procedentes de la consulta de enfermedades mitocondriales dentro de los siguientes intervalos: lactato 0,6-7,5 mmol/L, AGNE 0,1-1,5 mmol/L, β-OHB 0,02-0,72 mmol/L, piruvato 0,034-0,225 mmol/L, AcAc 0,02-0,151 mmol/L y glucosa 3,82-9,27 mmol/L, según los procedimientos utilizados anteriormente en nuestro laboratorio y según la adaptación de dichos procedimientos al sistema Viva Vitalab®.

Para realizar la medición del lactato, β-hidroxybutirato, AGNE y glucosa se utilizaron los mismos reactivos, aunque anteriormente se analizaban en un autoanalizador Hitachi 704 (Roche Diagnostic GmbH Mannheim, Alemania).

Las mediciones del piruvato y acetoacetato las realizábase por una reacción enzimática manual (14).

– Métodos estadísticos: Regresión lineal (método de mínimos cuadrados) y coeficiente de correlación de Spearman (15) para el estudio de linealidad y método de Passing-Bablok (16) para el estudio de correlación entre procedimientos.

RESULTADOS

– *Estudio de imprecisión:* La tabla II muestra los resultados de imprecisión de los dos controles para cada una de las magnitudes. Los coeficientes de variación oscilan entre 0,30 % en

Tabla II. Estudio de imprecisión.

Magnitud	CV Intradiario (%)		CV Interdiario (%)	
	Control N	Control E	Control N	Control E
Lactato	1,13	0,84	4,90	2,99
AGNE	1,34	0,30	7,31	4,85
β-OHB	4,93	1,60	9,62	5,88
Piruvato	3,64	2,65	8,20	4,60
AcAc	6,39	4,39	11,22	8,44
Glucosa	0,62	1,47	2,32	1,93

CV: coeficiente de variación; Control N: Control con valores dentro del intervalo de referencia; Control E: Control con valores fuera del intervalo de referencia; AGNE: ácidos grasos no esterificados; β-OHB: β-hidroxybutirato; AcAc: acetoacetato.

Tabla III. Estudio del límite de detección.

Magnitud	Límite de detección (mmol/L)
Lactato	0,062
AGNE	0,010
β-OHB	0,030
Piruvato	0,019
AcAc	0,016
Glucosa	0,016

AGNE: ácidos grasos no esterificados; β-OHB: β-hidroxybutirato; AcAc: acetoacetato.

Tabla IV. Estudio de linealidad

Magnitud	Concentración basal (mmol/L)	Recta de regresión	Coefficiente de correlación
Lactato	4,6	$y = 0,963 x - 0,021$	0,9999*
AGNE	1,0	$y = 0,957 x + 0,013$	0,9996*
β-OHB	1,0	$y = 1,059 x - 0,013$	0,9998*
Piruvato	0,45	$y = 1,051 x - 0,012$	0,9999*
AcAc	1,0	$y = 0,831 x + 0,053$	0,9967*
Glucosa	27,6	$y = 0,905 x - 0,009$	0,9999*

* $P < 0,001$

AGNE: ácidos grasos no esterificados; β-OHB: β-hidroxybutirato; AcAc: acetoacetato.

el caso de los ácidos grasos no esterificados hasta 11,22 % en el acetoacetato.

– *Límite de detección:* La tabla III muestra los límites de detección correspondientes a cada una de las magnitudes.

– *Linealidad:* La tabla IV muestra las rectas de regresión y el coeficiente de correlación entre las concentraciones teóricas y las experimentales de las diez diluciones realizadas para cada magnitud estudiada.

– *Estudio de correlación:* En la tabla V se muestran las ecuaciones de las rectas de regresión y los intervalos de confianza del 95% para las pendientes y las intersecciones entre los procedimientos empleados anteriormente en el laboratorio y la adaptación al Viva Vitalab®, para cada una de las magnitudes estudiadas.

Tabla V. Estudio de correlación entre los procedimientos empleados anteriormente y la adaptación al Viva Vitalab®.

Magnitud	Pendiente (IC 95%)	Intersección (IC 95%)
Lactato	0,864 (0,833→0,888)*	-0,014 (-0,063→0,050)
AGNE	1,000 (0,950→1,060)	-0,010 (-0,020→0,015)
β-OHB	0,897 (0,833→1,000)	-0,006 (-0,013→0,001)
Piruvato	1,211 (1,032→1,500)*	-0,020 (-0,040→-0,005)**
AcAc	1,179 (0,854→1,734)	0,006 (-0,016→-0,017)
Glucosa	0,982 (0,964→1,000)	-0,004 (-0,150→0,050)

*: Desviación significativa del 1; **: Desviación significativa del 0

AGNE: ácidos grasos no esterificados; β-OHB: β-hidroxibutirato; AcAc: acetoacetato.

DISCUSIÓN

Los marcadores bioquímicos del metabolismo intermediario son muy utilizados en la práctica clínica diaria. Estas magnitudes son de sumo interés para una primera orientación en casos de errores congénitos o adquiridos del metabolismo, en la valoración de la homeostasis energética o como integrantes del anión gap, de gran importancia en las urgencias médicas (17), en casos de acidosis metabólicas y de enfermedades neuromusculares (18). Por todo ello, se debe disponer en el laboratorio de métodos rápidos, precisos y fiables para ofrecer al clínico la información necesaria en cada momento. Nosotros hemos realizado una evaluación de seis magnitudes de metabolismo intermediario en el analizador Viva Vitalab® para poder realizar la medición conjunta y así eliminar procesos manuales, siempre más lentos y con mayor probabilidad de error.

En la práctica diaria existen algunas dificultades como es la preparación de la muestra. Para la determinación de lactato y glucosa, está claramente descrito que es indispensable la adición de fluoruro, con el fin de frenar la glucólisis (19). Los ácidos grasos no esterificados y el β-hidroxibutirato no necesitan el fluoruro (20), pero su presencia no afecta a su determinación, por lo que se utilizó la misma muestra, evitándose así la extracción de mayor volumen de sangre y aprovechando la posibilidad del autoanalizador de programar las cuatro determinaciones a la vez.

Para el piruvato y AcAc la desproteinización debe ser completa e inmediata, ya que estos metabolitos son muy inestables, para evitar errores en los resultados (14). Por otro lado, es necesaria la misma desproteinización en calibradores y controles para mantener condiciones idénticas de pH y dilución que en las muestras, pero éstos pueden prepararse con anterioridad y mantenerse congelados, lo que permite su rápida utilización en casos de urgencias médicas.

Un problema que nos encontramos fue la ausencia de controles comerciales en el caso de los ácidos grasos no esterificados, y de calibradores y controles de acetoacetato. Esto fue solucionado diluyendo los calibradores, en el caso de los primeros o preparándolos nosotros mismos a partir de soluciones de acetoacetato de litio, en el segundo caso. Somos conscientes de la falta de efecto matriz en dichos controles, pero no encontramos otra posibilidad de resolver este problema.

En las determinaciones cuyos procedimientos de análisis requieren pasos manuales, como en el caso del acetoacetato y del piruvato, cabe resaltar lo complicado que nos resultó auto-

matizarlos, porque partimos de un procedimiento manual con elevado volumen de muestra (1 mL) y muy bajo volumen de reactivo (0,01 mL). Es muy difícil encontrar un autoanalizador capaz de tener en su programación la capacidad de dispensar más volumen de muestra que de reactivo. Una vez probados otros autoanalizadores de nuestro laboratorio sin poder conseguirlo, lo logramos sólo en el Viva Vitalab®, pero diluyendo los tres reactivos utilizados (NADH, LDH e hidroxibutirato deshidrogenasa) con el mismo tampón de reacción (*Trizma base solution*).

Por otra parte, con esta adaptación hemos conseguido reducir significativamente el volumen de muestra, lo cual es una gran ventaja, principalmente para la población pediátrica.

Los resultados del estudio de imprecisión, límite de detección y linealidad para las seis magnitudes en el Viva Vitalab® fueron satisfactorios. Una vez realizada la evaluación, llevamos a cabo el estudio de correlación entre los procedimientos utilizados anteriormente y los adaptados al autoanalizador Viva Vitalab®. Para ello utilizamos el método de Passing-Bablok. Los resultados han sido satisfactorios para el β-OHB, AGNE, acetoacetato y glucosa, detectándose un error proporcional en el lactato y piruvato y un error constante en el piruvato. Estos resultados en el caso del piruvato son debidos, probablemente, a que comparamos un procedimiento totalmente automatizado con otro que conlleva varios pasos manuales, con las consiguientes posibilidades de error.

A la vista de estos resultados, podemos concluir que la adaptación de estos seis metabolitos al autoanalizador Viva Vitalab® resulta fiable y de elevada practicabilidad para la rutina de un laboratorio de análisis.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Manuela Gómez, Blanca Navalón, Angela Fernández, Ana Montañó y Monserrat Ramos la colaboración prestada.

La correspondencia se dirigirá a:
Dra. Pilar Gómez.
Mauricio Legendre 17, 7^oD 28046.
Madrid.
Tfno: 913908276. FAX: 913908446.

BIBLIOGRAFÍA

- Mattox TW, Teasley-Strausburg KM. Overview of biochemical markers used for nutrition support. DICP 1991; 25: 265-71.
- Luft FC. Lactic acidosis update for critical care clinicians. J Am Soc Nephrol 2001; 12: 15-9.
- Poggi-Travert F, Martin D, Billette de Villemeur T, Bonnefont JP, Vasault A, Rabier D *et al.* Metabolic intermediates in lactic acidosis: compounds, samples and interpretation. J Inher Metab Dis 1996; 19: 478-88.
- Hotchkiss RS, Karl IE. Reevaluation of the role of cellular hypoxia and bioenergetic failure in sepsis. JAMA 1992; 267: 1.503-10.
- Schlichtig R, Kliens HA, Kramer DJ, Nemoto EM. Hepatic dysoxia commences during oxygen supply dependence. J Appl Physiol 1992; 72: 1.499-505.
- Mousson B, Maire I, Carrier H, Flocard F, Flechaire A, Vidailhet M. Mitochondrial cytopathies. Rev Med Interne 1991; 12: 219-26.
- Mitchell GA, Kassovska-Bratinova S, Boukaftane Y, Robert MF, Wang SP, Ashmarina L. Medical aspects of ketone body metabolism. Clin Invest Med 1995; 18: 193-216.
- Artiss J, Raymond EK, Cavanagh KT, Collins SL, Peterson VJ, Varma S *et al.* A liquid-stable reagent for lactic acid levels. Am J Clin Pathol 2000; 114: 139-43.
- Itaya K and Michio U. Colorimetric determination of free fatty acids in biological fluids. J Lip Res 1965; 6: 16-20.

10. Williamson DH, Mellenby J, Krebs HA. Enzymatic determination of D- β -hydroxybutyrate acid and acetoacetic acid. *Biochem J* 1962; 82: 90-6.
11. Vassault A, Bonnefont JP, Specola N, Saudubray JM. Lactate, pyruvate and ketone bodies. *Techniques in diagnostic human biochemical genetics: A laboratory manual*. New York: Wiley-Liss 1991: 285-308.
12. Werner W, Rey HG, Weilinger H. Properties of a new chromogen for the determination of glucose in blood by the GOD-POD method. *Z Analyt Chem* 1970; 252: 224-2.
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of precision performance of Clinical Chemistry devices. Tentative Guideline. NCCLS document EPS-T2, Villanova: NCCLS. 1992.
14. Aparicio J, Coca C, Arreaza L, García-Silva MT, Vargas C, Gómez P. Valores de referencia de diversos constituyentes relacionados con el metabolismo energético en niños. *Quim Clin* 1995; 14: 346-9.
15. Stockl D, Dewite K, Thienpont TM. Validity of linear regression in method comparison studies: it is limited by the statistical model or the quality of the analytical input data? *Clin Chem* 1998; 44: 2.340-6.
16. Passing H, Bablock W. A new biochemical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. *J Clin Chem Biochem* 1983; 21: 709-20.
17. Arens R, Gozal D, Williams JC, Ward SL, Keens TG. Recurrent apparent life-threatening events during infancy: a manifestation of inborn errors of metabolism. *J Pediatr* 1993; 123: 415-8.
18. Darras BT, Friedman NR. Metabolic myopathies: a clinical approach; part I. *Pediatric Neurol* 2000; 22: 171-81.
19. Braybrooke J, Lloyd B, Natrass M, Alberti KGMM. Blood sampling techniques for lactate and pyruvate estimation: A reappraisal. *Ann Clin Biochem* 1975; 12: 252-4.
20. Custer EM, Myers JL, Poffenbarger PL, Schoen I. The storage stability of 3-hydroxybutyrate in serum, plasma and whole blood. *Am J Clin Pathol* 1983; 80: 375-80.