



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

MANUAL DE PRÁCTICAS

BIOQUÍMICA CLÍNICA

(CLAVE 1807)



MÉXICO, D. F.

2009

El laboratorio clínico es un ambiente dinámico que esta continuamente cambiando para a satisfacer las necesidades de salud pública. El presente manual será de mucha utilidad como recurso informativo en la formación de los alumnos en el área de Bioquímica Clínica. El aspecto valioso de la información es que tiene un enfoque actual de los procesos habituales de laboratorio como la tendencia tecnológica de la automatización, lo que permite enfrentar el reto de manejar pruebas mas sensibles, específicas y efectivas en el monitoreo de la salud y la enfermedad. Además, la posibilidad de obtener resultados a tiempo y el costo-beneficio que representa.

Es recomendable la introducción de la terminología actual, completar la información acerca de los organismos y guías de regulación de las buenas prácticas de laboratorio

La elaboración de éste manual estuvo a cargo de la Q.F.B Rosalinda Velázquez Salgado a través de su sección de Bioquímica Aplicada

CONTENIDO

PRÓLOGO

INTRODUCCIÓN

UNIDAD I

1. INFORMACIÓN SOBRE EL CONTROL DE CALIDAD EN EL LABORATORIO CLÍNICO

- 1.1 Etapa preanalítica
- 1.1 Etapa analítica
- 1.1. Etapa Post-analítica
- 1.2 Toma de muestra
- 1.3 Estudio de la variación en condiciones de rutina

UNIDAD II

2. PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO RENAL.

- 2.1 Determinación de Ácido úrico. *Método enzimático.*
- 2.2 Determinación de Urea. Método enzimático
- 2.3 Determinación de Creatinina . *Bossnes- Taussky.*
- 2.4 Determinación de sodio/potasio/cloro . *Método Ión Selectivo*
- 2.5 *Determinación de pH, pPO₂, pCO₂. Gasometría*
- 2.6 Examen general de orina (EGO)

UNIDAD III

3. METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS Y LÍPIDOS

- 3.1. Determinación de Glucosa. Método enzimático (GOD-PAD)
- 3.2. Determinación de Colesterol total. . Método enzimático (CHOD-PAD)
- 3.3. Determinación de Triglicéridos. Método enzimático

UNIDAD IV

4. METABOLISMO ÓSEO Y MINERAL

- 4.1 Determinación de Calcio. Método Colorimétrico
- 4.2 Determinación de Fósforo. Método UV

UNIDAD V

5. PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO HEPÁTICO. Método colorimétrico

- 5.1 Determinación de Bilirrubina. *Método DMSO Total y Directa*
- 5.2 Albúmina. Método verde de Bromocresol
- 5.3 Proteínas totales. *Método de Biuret*
- 5.4. INTRODUCCIÓN A LA ENZIMOLOGÍA CLÍNICA.
- 5.5 Determinación de fosfatasa Alcalina. *Método cinético*
- 5.6 Determinación de *gama Glutamyltransferasa*. GGT *Método cinético*
- 5.7. Determinación de aspartato aminotransferasa GOT (ASAT) . *Método cinético*
- 5.8 Determinación de alanino aminotransferasa GPT (ALAT) . *Método cinético.*
- 5.9 Determinación de lactato deshidrogenada (LDH). *Método cinético.*

UNIDAD VI

PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO PANCRÉATICO.

6.1 Determinación de lipasa. LPS *Método cinético*

6.2 Determinación de α - amilasa. AMY *Método cinético*

UNIDAD VII

7. PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO CARDÍACO.

7.1 Determinación de alanino aminotransferasa GPT. *Método cinético.*

7.2 Determinación de creatin cinasa CK. *Método cinético.*

7.3 Determinación de lactato deshidrogenada. LDH. *Método cinético.*

PRUEBAS AUTOMATIZADAS

Autoanalizador utilizado en Química Clínica

8. BIBLIOGRAFÍA

Glosario

PRÓLOGO

La Bioquímica Clínica es un campo multidisciplinario cuya finalidad es la aplicación de la Ciencia Química para contribuir a la resolución de problemas de salud.

La función del laboratorio de Bioquímica Clínica es realizar análisis, tanto cualitativos como cuantitativos, en fluidos corporales como sangre, orina, líquido seminal, líquido cefalorraquídeo, etc. Para que los resultados de dichos análisis sean útiles a los médicos en el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de una enfermedad, éstos deberán realizarse bajo un estricto control de calidad logrando niveles óptimos de precisión y exactitud, características deseables en cualquier resultado de diagnóstico.

Los objetivos del curso son:

1. Que el alumno sea capaz de realizar el análisis de productos biológicos incluyendo una adecuada manipulación de los especímenes, desde la toma y/o recepción de muestras hasta la entrega de resultados.
2. Que el alumno adquiera una formación y preparación en Bioquímica que le permita afrontar los retos que encontrará en su vida profesional, ante el creciente número de técnicas que continuamente se están desarrollando para la detección y cuantificación de metabolitos de interés en la medicina moderna.
3. Que el alumno realice los procedimientos correctos tanto en forma manual como automatizada utilizando un equipo mecanizado.
4. Que el alumno adquiera los elementos formativos que le permitan desarrollar una actitud y pensamientos críticos, y de independencia en el trabajo.

Este proceso de enseñanza incluye: planeación, selección, elaboración y ejecución analítica, evaluación y resolución de problemas con la metodología empleada, aplicación e interpretación de programas de control de calidad, interpretación de gráficas y correlación de los datos obtenidos con las alteraciones que se presentan en el organismo en los diferentes cuadros patológicos.

Este manual fue elaborado con base en la Norma Oficial Mexicana "NOM -166-SSA-1-1997" que actualmente se encuentra en revisión Proy- NOM -007-SSA1-2006", para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos, misma que pretende lograr que los laboratorios clínicos establezcan programas de aseguramiento de la calidad de sus servicios.


El curso de la asignatura práctica de Bioquímica Clínica hace énfasis en el control de calidad. Las prácticas están diseñadas con el propósito que los alumnos dispongan de un conjunto de habilidades que les permitan la aplicación flexible de las técnicas manuales y además utilicen equipos semiautomatizados como automatizados, (equipo de uro-análisis, gasómetro, ión selectivo y autoanalizador para química clínica que con más frecuencia se emplean en las actividades propias del ámbito profesional.

Los residuos originados en las prácticas permanecerán en el laboratorio 301 hasta que sean recogidos y tratados en la facultad de química en el programa Unidad de Gestión Ambiental a cargo de la Dra. Elvira Santos Santos.

Los residuos biológico infecciosos como Punzo-cortantes, algodón con sangre, se recolectan y almacenan en los contenedores de deposito temporal (Lab.301) en recipientes rígidos o bolsas de color rojo dependiendo del desecho, con el emblema **RPBI's** y son llevados cada miércoles por el personal auxiliar de laboratorio o laboratorista al camión de recolección de **RPBI's**. Los residuos como sangre, plasma, suero, paquete globular, materiales con sangre o sus derivados se tratan internamente en el laboratorio de acuerdo a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002.⁽¹²⁾

TRATAMIENTO DE RESIDUOS TÓXICOS:

Los desechos que se produzcan en cada sesión de práctica deben recolectarse en recipientes previamente etiquetados con el siguiente emblema:

| | |
|---|--|
|  | Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Química |
| Facultad de Química | |
| RESIDUO | |
| () Líquido _____ | CARACTERÍSTICA: |
| () Sólido _____ | |
| Laboratorio _____ | • Corrosivo () |
| Responsable _____ | • Reactivo () |
| | • Explosivo () |
| | UGA TÓXICO () |
| | • Inflamable () |
| _____ | |
| Fecha | |

INTRODUCCIÓN

Los nuevos métodos analíticos se desarrollan con el fin de mejorar la exactitud y la precisión de los métodos existentes, también tiene el propósito de permitir el manejo de equipo automatizado, para reducir los costos de los reactivos o de la mano de obra, o para medir un compuesto nuevo. En cualquier caso, se debe verificar experimentalmente el rendimiento analítico en el laboratorio clínico mismo, aun si se cree que el método nuevo es una mejora con respecto a los métodos anteriores. La extensión de los experimentos y la interpretación de los datos van a depender del propósito de la evaluación y de quien la realiza, pero el fundamento básico y el diseño experimental son similares en todas las evaluaciones.

El proceso de evaluar un método es distinto del proceso rutinario para el control de calidad, después de haber sido introducido en la rutina diaria. El control de calidad rutinario (diario) es un proceso establecido por medio del cuál se detectan los incrementos en los errores analíticos de un método con el fin de evitar la liberación de datos incorrectos de los pacientes. El control de calidad rutinario detecta los errores sólo cuando estos son superiores a los errores presentes registrados en el momento que se establecieron los intervalos para los controles. El uso del control de calidad rutinario no le permite al investigador determinar la magnitud de los errores inherentes del método o de decidir si son aceptables.

EVALUACIÓN DE MÉTODOS

En México las metas de calidad las rige el Reglamento de Ley General de Salud, que indica en su artículo 158 "los laboratorios deberán emplear reactivos y medios... de la más alta calidad" y se cuenta con organismos que acreditan la competencia técnica, como la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA), además de CLIA '88. Es necesario experimentar la evaluación de los métodos para establecer los errores analíticos inherentes del método y relacionarlos con los requisitos médicos o reglamentarios.

Las evaluaciones de los métodos en la mayoría de las veces son realizadas por el personal del laboratorio en los hospitales y laboratorios comerciales. Estas evaluaciones se hacen con el fin de determinar si el rendimiento del método cumple, primariamente con los requisitos de aplicación médica dispuestas para el usuario y, secundariamente las metas de calidad especificadas por CLIA '88 se cumplen para tener un rendimiento exitoso en las pruebas de aptitud

La decisión de aceptar o rechazar un método posible para el laboratorio se debe basar en la capacidad del método para cumplir con los requisitos del usuario final, el médico, que por otra parte que es quien usa los resultados de la prueba del laboratorio.

Características del método

El paso siguiente en el proceso de selección, es la definición de las características metodológicas ideales que permitirán que el método seleccionado tenga buena probabilidad de éxito en el laboratorio. Estas características incluyen la metodología preferida, que tendrá potencialmente la especificidad química necesaria (libre de interferencias) y sensibilidad química (capacidad de detectar cantidades pequeñas o pequeños cambios en la concentración del compuesto analizado). También es importante la capacidad de usar estándares acuosos para calibrar (libertad de efectos de matriz). La elección de reactivos, temperatura, tiempo de reacción, tiempo de medición y tipo de medición (como métodos de determinación de un punto, dos puntos o cinéticos), son características de un método que deben definirse. La IFCC abreviatura de *Internacional of Federation Clinical Chemistry and laboratory Medicine* y AACC *asociación Americana de Química Clínica* han desarrollado una serie de recomendaciones para los métodos empleados en química clínica, la familiaridad del operador con el procedimiento del método; la estabilidad de los calibradores, controles y reactivos; y la linealidad de la respuesta a través de todo el intervalo de trabajo.

Error aleatorio y error sistemático

Por lo general, los errores que afectan el rendimiento de los procedimientos analíticos se clasifican en aleatorios o sistemáticos. Los factores que contribuyen al error aleatorio, son los que afectan la reproducibilidad de la medición. Entre estos se incluyen: (1) la inestabilidad del instrumento, (2) variaciones en la temperatura, (3) variaciones en los reactivos y calibradores (y la estabilidad de la curva de calibración), (4) variabilidad en las técnicas de manejo como el pipeteo, mezcla y control de los tiempos y (5) variabilidad en los operadores. Estos factores sobreponen sus efectos entre sí a diferentes tiempos. Algunos producen fluctuaciones muy rápidas y, otros, ocurre en períodos más largos de tiempo. Por consiguiente, el error aleatorio (RE) tiene componentes diferentes de variación que están relacionados con la disposición actual del laboratorio. El componente de variación *dentro de una corrida* (c.v. w_r) es causado por etapas específicas en el proceso, tales como la precisión en el pipeteo y variaciones a corto plazo de la temperatura y la estabilidad del instrumento. La variación intradiaria *entre corridas* (c.v. b_r) es causada por la inestabilidad de la curva de calibración o por diferencias en recalibración que ocurren a través del día, variaciones a más largo plazo en el instrumento, cambios pequeños en las condiciones del laboratorio durante el día y la fatiga del personal del laboratorio. El componente *intradía* de variación es causado por variaciones en el instrumento que ocurren a través de los días, cambios en los calibradores y reactivos (especialmente si se abren frascos nuevos cada día) y cambios en el personal de día a día. Aunque no es un componente aleatorio real de variación, cualquier variación en la curva de calibración a través del tiempo también afectará de manera considerable el componente intradiario de variación. Estos componentes se pueden combinar de tal manera que se puede obtener un cálculo de la varianza total del método.

Entre los términos usados para indicar el error aleatorio se incluyen *precisión, imprecisión, reproducibilidad y repetibilidad*. En cada uno de los casos se refieren a la dispersión aleatoria de los resultados de las mediciones alrededor de algún punto de tendencia central.

El error sistemático (ES) describe el error que es consistentemente alto o bajo. Si el error es consistentemente bajo o alto en la misma cantidad, independientemente de la concentración se designa como error sistemático *constante*. Si el error es consistentemente bajo o alto en una cantidad proporcional a la concentración del compuesto analizado, se conoce como error sistemático *proporcional*.

Los factores que contribuyen al error sistemático constante son independientes de la concentración del compuesto analizado, y la magnitud del error es constante a través de todo el intervalo de la concentración del compuesto analizado. El error sistemático constante es causado por una sustancia interferente presente en las muestras o los reactivos, provocando una señal falsa. El error puede ser positivo o negativo. Una reacción entre una sustancia interferente y los reactivos causada por una falta de especificidad es un ejemplo de error sistemático constante.

Otra causa de un error sistemático es una sustancia interferente en la reacción entre el compuesto analizado y los reactivos. Se observa este tipo de error en los métodos enzimáticos que usan reacciones acopladas oxidasa-peroxidasa en las cuales el peróxido de hidrógeno formado es destruido por agentes reductores endógenos, tales como el ácido ascórbico. Las sustancias interferentes también pueden inhibir o destruir el reactivo de modo que queda en cantidad mayor para reaccionar con el compuesto analizado. Una fuente no química de error sistemático constante es el error causado por el uso de blancos inapropiados de la muestra o los reactivos.

La causa más frecuente de error proporcional es la asignación incorrecta de la cantidad de sustancia en el calibrador. Si el calibrador tiene más compuesto analizado que la indicada en el rótulo, todas las determinaciones desconocidas darán bajas; una menor cantidad del compuesto que el rotulado provocará un error positivo. El error será proporcional al error de calibración original. El error proporcional también puede ser causado por una reacción secundaria del compuesto analizado. El porcentaje de la sustancia a determinar que participa en la reacción secundaria, será el porcentaje de error en el método.

Error constante calculado a partir de estudios de interferencia

El estudio de interferencia mide el error constante causado por la presencia de una sustancia sospechosa de interferir con el método en estudio. Para realizar este estudio se toma una muestra a la cual se le ha agregado el interferente. El volumen de esta adición debe ser pequeño, menos del 10% del volumen de muestra para que el efecto sobre la matriz de la muestra sea mínimo. Con el fin de compensar la dilución de la muestra se debe preparar una muestra de línea de base mediante la adición de una cantidad igual del solvente usado para el interferente, en otra alícuota de la muestra. A continuación se deben analizar las dos muestras, por lo menos por duplicado. La diferencia entre los resultados en las dos muestras se puede atribuir a la interferencia causada por la sustancia añadida.

El límite de cuantificación (L_Q) que es el valor mínimo de la magnitud que puede estimarse con una imprecisión aceptada (habitualmente el 10%) (IUPAC).

EL límite de detección (L_D) que es el valor mínimo de la magnitud para el cual la probabilidad de que el valor estimado no exceda al valor crítico es β (habitualmente 0.05).

El valor crítico (L_c) que es el valor mínimo de la estimación de una magnitud para el cual la probabilidad de que el valor verdadero de la magnitud sea cero es α (habitualmente 0.05). En el laboratorio clínico, los interferentes más frecuentes son hemólisis, lipemia e ictericia .

Un esquema para estudiar los efectos de la hemólisis consiste en tomar dos muestras de sangre. Una es centrifugada y analizada directamente (muestra de base) y los glóbulos rojos del otro tubo son traumatizados físicamente para romper las membranas celulares con el fin de obtener una cantidad elevada de hemoglobina sérica. La muestra hemolizada es analizada después de centrifugarla. La diferencia entre las dos muestras se atribuye a los efectos de la Se puede simular una hemólisis ligera, moderada o severa dependiendo del volumen de glóbulos rojos traumatizados. Este enfoque tiene más coherencia con los problemas encontrados en el laboratorio, que el enfoque en el cual se añade hemoglobina pura a la muestra. Sin embargo, el procedimiento no es válido si los glóbulos rojos contienen el compuesto analizado.

Se pueden estudiar los efectos de la lipemia dividiendo una muestra lipémica en dos porciones; una se analiza directamente y la otra se somete a ultracentrifugación antes de su análisis para eliminar las lipoproteínas.

La elección de sustancias a probar es casi infinita. Para todos los métodos espectrofotométricos se debe determinar los efectos de hemólisis, ictericia y lipemia. También se deben ensayar otras sustancias que hayan sido reportadas como interferentes para métodos similares. El pipeteo debe ser (1) preciso, para que las muestras de línea de base y las que contienen el interferente reflejen el mismo grado de dilución y (2) exactas con el fin de añadir una cantidad conocida de sustancia interferente. Nuevamente, resulta importante que la concentración del compuesto analizado en la muestra esté cercana a los niveles de decisión médica. Se debe añadir la sustancia considerada como posible interferente, de tal manera que su concentración final sea la máxima fisiológicamente esperada. Si no se producen errores a esta concentración tan elevada, se puede asumir que concentraciones menores no afectarán de manera adversa el rendimiento del método. Si el error es demasiado grande a la concentración máxima de sustancia interferente, es conveniente comprobar las interferencias a concentraciones menores. Una muestra ligeramente ictérica puede ser aconsejable, pero una francamente ictérica, no. Se recomienda que estos estudios de interferencia sean realizados también al mismo tiempo con un método comparativo, con el fin de verificar la técnica experimental.

Medidas cinéticas.

Un método frecuentemente usado para la corrección de la interferencia espectral es la medición de una típica *reacción de punto final*, como lo es la reacción cinética de dos puntos. Si se monitorea la absorbancia de una reacción

colorimétrica no instantánea en función del tiempo, se observa una curva de reacción. Una reacción de punto final se monitorea a un solo punto de tiempo, cuando la reacción casi se ha completado. Si no hay interferencias espectrales, la curva de reacción debería pasar por el origen. Si existe este tipo de interferencia, la curva será *paralela* a la original, pero sesgada hacia valores más elevados debido al color endógeno de la muestra. Si se usa un blanco de muestra para restar el color endógeno, se obtendrá una línea idéntica a la de la muestra que no contiene interferencias.

En un ensayo cinético de dos puntos, la absorbancia es medida a dos puntos diferentes de tiempo; cuando (1) el desarrollo final de color no ha ocurrido y de hecho puede ser pequeño y, (2) cuando la respuesta de absorbancia versus tiempo es todavía lineal.

La lectura inicial se toma realmente cuando casi no ha ocurrido formación de color. De esta manera, cualquier absorbancia a este tiempo es principalmente ocasionada por interferentes espectrales endógenos. Después de un tiempo corto se toma una segunda lectura cuando se ha formado solamente una pequeña cantidad de color y la respuesta de absorbancia versus tiempo es todavía lineal. Esta absorbancia por lo tanto incluye la del color endógeno original y la del color producido debido a la reacción analítica específica. Al substrair la primera lectura de la segunda, la *delta de absorbancia* calculada (DA) es causada solamente por el color específico formado por la reacción analítica. En la curva estándar basada en los análisis cinéticos se grafica el cambio en la absorbancia (DA) versus la concentración. En esta curva estándar la presencia de un interferente coloreado, no reactivo, endógeno, no tiene efecto. Por consiguiente no se necesita hacer una medición separada de blanco de muestra; una reacción cinética de dos puntos es por sí misma un blanco cuando no hay cambio en la naturaleza del interferente durante la reacción. Esta es una técnica importante cuando se están desarrollando análisis químicos automatizados en un gran número de muestras.

Análisis bicromático.

Muchos instrumentos de uso corriente emplean diferentes técnicas para la corrección de interferencias espectrales. Esta técnica involucra la medición de la absorbancia de una mezcla de reacción a dos longitudes de onda diferentes simultáneamente. Estas son la longitud de onda principal (λ_1) y otra longitud de onda cercana λ_2 . y, λ_1 es la longitud de onda a la cual el cromógeno tiene la máxima absorción. En λ_2 hay un mínimo de absorción del cromógeno. Como la reacción es monitoreada simultáneamente a dos longitudes de onda, ésta es conocida como análisis bicromático. Esta técnica está basada en la premisa que aunque un compuesto puede dar una interferencia espectral, la absorbancia máxima del interferente será diferente de la de la reacción analítica verdadera. Además, este procedimiento se realiza bajo la presunción que la absorción causada por el compuesto interferente es aproximadamente la misma en λ_1 que en λ_2 . Aunque la absorbancia medida a λ_1 será producida por ambas, la reacción analítica y el interferente, la absorbancia a la segunda longitud de onda (λ_2) será causada solamente por el interferente. El uso de este procedimiento

permite también que cada muestra sea utilizada como su propio blanco para el color endógeno.

Otro método similar para la corrección de la interferencia de fondo es la medición de la absorbancia a la longitud de onda primaria A_{\max} y a dos longitudes de onda adicionales, generalmente equidistantes del pico, A_1 y A_2 . Las lecturas de absorbancia a estas dos últimas longitudes de onda son promediadas para dar la absorbancia de fondo promedio en la muestra. Esta técnica para la corrección de la absorbancia de fondo de las sustancias interferentes es conocida como la *corrección de Allen*.

Dilución.

Como se discutió en el caso de la turbidez, la dilución de una muestra que contiene interferentes espectrales puede algunas veces reducir el problema. Se debe ser cuidadoso en no diluir en exceso el compuesto deseado o el cromógeno a una concentración por debajo del nivel mínimo detectable para ese ensayo. Muchas diluciones deben ser analizadas simultáneamente para determinar la dilución más efectiva.

Interferencias químicas

Todas las interferencias que se discutieron hasta ahora han sido interferencias espectrales causadas por compuestos que no participan en la reacción química analítica. Sin embargo, muchas interferencias reaccionan con las sustancias analizadas. Los productos de reacción de estas interferencias generalmente provocan interferencias positivas, aunque se han observado interferencias negativas.

Los tipos de interferentes reactivos químicamente, no específicos pueden variar ampliamente,. El ácido úrico produce una interferencia positiva, y la bilirrubina y el ácido ascórbico producen interferencias negativas en los métodos de glucosa oxidasa usados para medir la glucosa. La reacción de picrato alcalino para la medición de creatinina presentan ambas interferencias positivas (cetonas, proteínas) y negativas (bilirrubina).

Corrección de las interferencias químicas

La eliminación de muchos de los interferentes químicos no específicos se logra frecuentemente por medio de una o más de las siguientes técnicas:

1. Diluyendo el interferente.
2. Aumentando la especificidad de la reacción.
3. Removiendo el interferente.
4. Monitoreando un ensayo por medición cinética.
5. Monitoreando un ensayo por medición bicromática.

La dilución de la muestra es un método efectivo en los casos de los interferentes que no reaccionan a la misma velocidad o producen la misma intensidad de color que el compuesto analizado. La interferencia por proteínas se minimiza en muchos analizadores automatizados por una dilución grande de la muestra.

El aumento de especificidad de una reacción analítica es a menudo lograda por el uso de enzimas específicas como reactivos. Los ejemplos de este método incluyen: la medición de glucosa por hexocinasa o glucosa oxidasa, ácido úrico por uricasa, y urea por ureasa. Las reacciones con base inmunoquímica son también usadas para aumentar la especificidad del análisis. Un ejemplo sería la medida de teofilina por inmunoensayo enzimático comparado con otros métodos, los cuales emplean absorbancia ultravioleta.

La separación de un interferente del compuesto analizado puede lograrse por el uso de: una muestra libre de proteínas, extracción líquido-líquido, o cromatografía de adsorción o partición. Las muestras libres de proteínas fueron originalmente preparadas por precipitación de las proteínas del suero y separación de la muestra libre de proteínas por filtración o centrifugación.

Los métodos de laboratorio logran confiabilidad diagnóstica una vez realizados los protocolos de validación clínica, a través de emplear grupo de pacientes en quienes se conoce la presencia o ausencia de niveles "normales" de lo que cuantifica el método.

1. INFORMACIÓN SOBRE EL CONTROL DE CALIDAD EN EL LABORATORIO CLÍNICO.

El laboratorio clínico es un servicio médico indispensable, cuya importancia ha ido creciendo y desarrollándose a lo largo de los años hasta ocupar un lugar central en la medicina.

La meta fundamental de los laboratorios clínicos es proporcionar datos confiables acerca de la composición de muestras obtenidas de pacientes, de tal forma que puedan contribuir al diagnóstico, tratamiento y seguimiento de diversas enfermedades. La obtención de datos verdaderamente confiables, requiere de la rigurosa aplicación de diferentes técnicas de control de calidad, teniendo siempre presente que el mejor sistema de control es el que permite prevenir, identificar y corregir los errores. Cuando no se dedica la atención suficiente a la calidad, se pueden presentar deficiencias serias.⁽¹⁾

Un laboratorio clínico debe tener como uno de sus propósitos principales, la producción de datos analíticos de alta calidad por medio del uso de mediciones analíticas que sean precisas, exactas y adecuadas para tal fin; conduciendo esto a resultados confiables. Para concretar este propósito se hace necesario la utilización de programas de control de calidad interno y externo, entre otros elementos, se debe recordar que se puede tener buena o mala calidad en todo tipo de sistemas analíticos ya sean éstos manuales o automatizados, por lo que se debe tener mucho cuidado en ambos casos.⁽⁴⁾

La meta de un sistema de control de calidad deberá ser que: “La variación en las determinaciones que se llevan a cabo en el laboratorio sea lo suficientemente pequeña para que no se afecte la utilidad “.⁽¹⁾

La realización de cualquier procedimiento analítico puede estar amenazada por cometer un sin número de errores, algunos de los cuales pueden llegar a tener consecuencias realmente serias.

Actualmente, frente a la demanda creciente de los usuarios del laboratorio clínico (médicos y pacientes) y como resultado del avance científico y tecnológico, se requiere controlar la operación total, incluyendo las etapas pre-analítica, analítica y post-analítica.⁽⁵⁾

1.1 ETAPA PREANALÍTICA

Las pruebas de laboratorio que miden un compuesto analizado en un espécimen de sangre u otro fluido corporal, son solicitadas por los médicos para evaluar el estado del paciente. Se asume que el resultado analítico obtenido es representativo de la concentración real del compuesto analizado en el paciente. Desafortunadamente, hay numerosos factores que pueden invalidar esta suposición. Un número de errores no analíticos pueden también cambiar la concentración de uno o más compuestos analizados en un espécimen de tal forma que los resultados no reflejan la condición fisiológica del individuo. Éstos factores son llamados colectivamente fuentes de error pre-analítico. De la misma forma

en que al controlar la temperatura, la longitud de onda, y tiempo de incubación se limitará el error analítico, el error pre-analítico también puede ser controlado.

Es responsabilidad de los laboratorios tomar medidas que minimicen las fuentes de error, desarrollando procedimientos estandarizados referidos a la preparación del paciente, la recolección de la muestra, los métodos de transporte y la preservación de la misma. (6)

1. Causas de Variación Previas a la Recolecta

A) Variables del ciclo biológico

Variación cíclica se refiere a los cambios en la concentración de los compuestos analizados, que ocurre de forma predecible a ciertas horas del día, semana o mes. El estudio de estos cambios cíclicos es llamado "cronobiología". La variación rítmica es típica de muchas funciones biológicas; la variación diurna en el metabolismo de drogas y la incidencia de infarto al miocardio son dos ejemplos de la importancia de este campo. La variación cíclica más reproducible es la circadiana, la cual ocurre durante el transcurso de un solo día.

La variación cíclica durante un período de tiempo mayor que un día (infradiana), también puede afectar los resultados en las pruebas de laboratorio. La variación circanual, la cual ha sido reportada en algunas sustancias, está relacionada con cambios en la dieta debido a la estación, o con la variación del clima.

Infradiana: mayor que un día (ejemplo, ciclo menstrual)

Circadiana :alrededor de un día

Ulfradianos :menmor de 24 hr

Pruebas Sujetas a Variación Diurna

Fosfatasa ácida *

ACTH

Catecolaminas

Cortisol (y otros esteroides adrenales)

Gastrina*

Hormona del Crecimiento*

Tolerancia a la Glucosa

Hierro

Osteocalcina*

Hormona Paratiroidea*

Prolactina*

Renina/aldosterona

TSH*

*Más alta en pasado meridiano (PM) y las otras, más altas en (A.M.)

Pruebas Afectadas por la Ingestión de Alimentos

Cloro*

Gastrina
Glucagón
Glucosa
Hormona del Crecimiento
Insulina
Calcio Ionizado
Fosfato *
Potasio *
Triglicéridos
pH en Orina

*Más bajo después de los alimentos; todos los demás, más altos. (6)

B) Variables físicas relacionadas con el paciente

El ejercicio físico es una causa común controlable de variación en los resultados de las pruebas de laboratorio.

Dentro de las pruebas químicas de rutina se ha observado que: el potasio, el fósforo, la creatinina y las proteínas séricas son significativamente alterados por un período breve de ejercicio. Con el ejercicio regular, hay un aumento en las enzimas relacionadas con la actividad muscular y un aumento en la concentración de ácido úrico en sangre. El ejercicio intenso, como correr en un maratón, produce una rápida elevación en la concentración del potasio, ácido úrico, bilirrubina y enzimas musculares, mientras que la concentración de glucosa y fósforo disminuyen significativamente. En personas sometidas a entrenamiento para competencias de distancias largas, las concentraciones de gonadotropina y esteroides sexuales están marcadamente disminuidas, mientras que la concentración de prolactina está aumentada.

La postura es una causa de variación preanalítica fácilmente controlable. En la posición de pie, se observa que un incremento en la presión hidrostática causa pérdida de agua y electrolitos procedentes del compartimiento del líquido intravascular, lo que a su vez da como resultando un aumento en la concentración de proteínas. (1)

Procedimientos para minimizar las variables en el paciente

a) Variables biológicas cíclicas.

El laboratorio deberá determinar cuales de las pruebas realizadas tienen cambios significativos de concentración, ya sean cíclicos o relacionados con la ingesta de alimento. En condiciones óptimas, los especímenes para estas pruebas deberán ser colectados tan pronto como el paciente despierte y que esté todavía en ayunas. Si hay un patrón de variación ultradiana, como lo hay para la mayoría de las hormonas pituitarias, se deberán coleccionar varios especímenes a intervalos mayores del ciclo usual, para proveer una noción exacta sobre la producción de hormonas.

b) Variables físicas.

Si se están colectando muestras para medir compuestos analizados, que son afectados por el ejercicio, es necesario interrogar al paciente para saber si ha realizado ejercicios vigorosos en las últimas 24 a 48 horas. Cualquier historia de ejercicio vigoroso deberá ser anotada en la forma de requisición e incluirse en el reporte final. Otra alternativa será pedirle al paciente que regrese después para la toma de esa muestra. Antes de la toma de muestra el estado de estrés es difícil de controlar; sin embargo, los médicos deberán estar informados sobre aquellas pruebas que pueden estar afectadas, así como de la magnitud del cambio inducido por el estrés, ya sea físico o mental. Hay casos donde resulta recomendable que el laboratorio solicite asesoría especial antes de llevar a cabo pruebas que son severamente afectadas por el estrés del paciente, tales como las pruebas de función adrenal o pituitaria, metabolitos de catecolaminas, análisis de lípidos y prueba de tolerancia a la glucosa. Los efectos provocados por la postura pueden minimizarse pidiendo a los pacientes ambulatorios, que permanezcan sentados por lo menos 15 minutos antes de la extracción de la sangre. Para los análisis que sufren alteraciones por la dieta, incluyendo las mediciones de tolerancia a la glucosa, hidroxiprolina, 5-HIAA y los metabolitos de las catecolaminas urinarias, es recomendable proveer al paciente con las indicaciones por escrito, antes de ser programado para la colecta de la muestra. Si pruebas tales como la medición de renina y aldosterona, tolerancia a la glucosa, orina de 24 horas, grasa en heces de 72 horas, requieren de una preparación especial del paciente, resulta buena práctica citar antes al paciente antes para entregarle una explicación detallada en una hoja impresa. (6)

2. Causas de Variación en la Recolecta de Sangre

Técnicas para la recolecta de sangre

El uso incorrecto de los procedimientos para obtener especímenes puede inducir errores significativos en los resultados finales de las pruebas de laboratorio; los errores relacionados con la colecta de muestras en el laboratorio son las causas más comunes de resultados erróneos. En hospitales de enseñanza, la flebotomía es llevada a cabo por una variedad de individuos (enfermeras, asistentes de médicos y estudiantes) quienes tienen un entrenamiento formal limitado o incluso carecen de él, en técnicas de flebotomía.

En la mayoría de los laboratorios, los especímenes son colectados usando tubos al vacío y agujas especialmente diseñadas, que simultáneamente permiten la punción de la vena y del tapón del tubo. Los tubos para colecta son hechos de vidrio, plástico los cuales estos últimos son usados con más frecuencia; ambos son apropiados para la mayoría de las pruebas. Muchos tubos están cubiertos con silicón, el cual reduce la adhesión del coágulo, permitiendo mejor separación del suero y de las células. Los tapones están típicamente hechos de hule.

En niños y adultos con difícil acceso venoso, puede hacerse una punción capilar para la obtención de la muestra. Ciertos micro tubos especiales, que contienen anticoagulantes pueden llenarse por capilaridad. La contaminación de la muestra con fluidos de tejido es una causa potencial de preocupación en todos los

procedimientos de colección capilar de sangre, ya que el fluido tisular virtualmente no contiene proteínas y, por lo tanto, no tiene compuestos analizados unidos a proteínas. Este tipo de contaminación puede ser minimizado usando solo la sangre que fluye libremente del sitio de punción. (6)

Tipos de muestras de sangre

Las diferencias que existen entre sangre arterial, venosa y capilar, son causas ocasionales de resultados erróneos. La sangre arterial es la fuente de nutrientes para todos los tejidos del cuerpo y es la mejor muestra para el análisis de la distribución de sustancias necesarias para los tejidos corporales como el oxígeno. La sangre venosa difiere de la sangre arterial en que tiene menores concentraciones de sustancias usadas en el metabolismo, tales como oxígeno y glucosa, y más altas concentraciones de productos de desecho tales como: ácidos orgánicos, amoníaco y dióxido de carbono.

Si sitios específicos como el pie se mantienen tibios, se pueden obtener muestras de sangre capilar que son muy parecidas a las de sangre arterial. En estados de poca perfusión tisular y en los neonatos, sin embargo, hay una diferencia significativa entre la presión parcial de oxígeno (PO_2) de la sangre capilar y la arterial. (6)

a) Errores relacionados con preservativos y anticoagulantes

Los preservativos y anticoagulantes son ampliamente usados para coleccionar muestras de sangre, orina y otros fluidos corporales. Cuando se extrae sangre del cuerpo y se deja coagular, ésta se separa en una fase líquida llamada suero y en un coágulo sólido conteniendo células sanguíneas y fibrina. Si se añade un anticoagulante como la heparina, la fase líquida es llamada plasma. El suero y el plasma son similares en muchos aspectos. El suero difiere del plasma en que carece de fibrina, disminuyendo el total de proteína en un promedio de 3 g/L. En la coagulación, las plaquetas liberan potasio al suero; la concentración de potasio en el plasma es aproximadamente de 0.2-0.3 mmol/L más bajo que el potasio en suero. Por razones desconocidas, la concentración de fósforo es más baja en plasma por un promedio de 2 g/L. En pacientes con algunos trastornos hematológicos estas diferencias son exageradas. Con estas pocas excepciones, el suero y el plasma heparinizado son usados indistintamente para pruebas de laboratorio. La selección del tipo de muestra depende de la instrumentación, métodos de ensayos y de la necesidad de rapidez en los resultados.

El EDTA, contenido en el tubo utilizado para la recolección de muestras en hematología, es usado también para algunos ensayos químicos porque la quelación de los cationes divalentes inactiva muchas enzimas y conduce a cambios in vitro de hormonas peptídicas y lípidos. La quelación de cationes tales como el hierro, magnesio y calcio, sin embargo, causa una disminución artificial de los resultados en la mayoría de los ensayos colorimétricos y reduce la actividad de enzimas, que requieren cationes activadores (fosfatasa alcalina y creatin cinasa). La contaminación de muestras con anticoagulantes, especialmente EDTA, es un problema común en muchos laboratorios. Debido al potencial del EDTA para

interferir en muchos ensayos, lo recomendable será que los tubos conteniendo EDTA deban llenarse al último. Si se está usando anticoagulante líquido, es importante asegurarse que sea proporcional la cantidad de sangre y anticoagulante. (6)

b) Errores relacionados con los tubos separadores de suero

Los tubos separadores de suero y plasma son usados por muchos laboratorios para simplificar el proceso de separación del suero (o plasma) de los elementos celulares. Los tubos separadores de suero y plasma, contienen un gel relativamente inerte e impenetrable, el cual tiene una densidad intermedia entre los elementos celulares y el plasma o suero. Durante la centrifugación, el gel se levanta desde el fondo del tubo y forma una barrera mecánica que evita que los cambios metabólicos afecten las concentraciones plasmáticas. Los tubos que contienen estos geles pueden ser centrifugados y almacenados sin ser destapados, reduciendo así el riesgo de producir aerosoles infecciosos y evitando en forma simultánea la evaporación. Algunos agentes terapéuticos se adsorben en el gel, disminuyendo falsamente las concentraciones de antidepresivos tricíclicos y ciertas drogas antiarrítmicas como el flecainide. Con estas excepciones, la mayoría de sustancias en plasma no son afectadas por el uso de geles separadores. (6)

c) Errores relacionados con las técnicas de recolecta inadecuada

Torniquetes.

El uso de los torniquetes constituye una importante causa, además controlable, de variación en los resultados de pruebas de laboratorio. Los torniquetes son ampliamente usados en flebotomías para bloquear el retorno venoso, causando dilatación de las venas y haciendo más fácil la identificación de un sitio de venopunción. Los torniquetes a menudo se permanecen colocados durante el proceso de venopunción asumiendo que la continua dilatación venosa permitirá una colecta más rápida de la muestra y evitará el "colapso" de la vena.

Aunque los torniquetes hacen el proceso de flebotomía más fácil, la disminución en el flujo de sangre que éstos inducen, causa cambios en los resultados de las pruebas de laboratorio que pueden predecirse. Un minuto después de aplicar el torniquete, el incremento de presión causa pérdida de agua y electrólitos del plasma hacia el espacio del fluido extracelular, produciendo una elevación en la concentración de proteínas, células y sustancias unidas a células y proteínas. Si un torniquete se deja por 5 minutos, la elevación en la concentración puede alcanzar hasta 15%. La magnitud de estos efectos puede diferir entre el primero y el último tubo colectados, mostrando una hemoconcentración mayor en las últimas muestras. (6)

Hemólisis.

La hemólisis ocurre cada vez que hay un trauma en los relativamente frágiles eritrocitos, ya sea durante la colecta o con menor frecuencia después de la flebotomía. Una causa poco común de hemólisis, es cuando se lleva a cabo la

flebotomía antes de que se seque el alcohol o cualquier otro desinfectante usado. Frecuentemente, la hemólisis es causada por un flujo turbulento no laminar, durante el proceso de colecta. Dentro de los tamaños de agujas que comúnmente se utilizan, la hemólisis no es causada por el uso de agujas muy grandes o muy pequeñas. El flujo no laminar ocurre comúnmente cuando la sangre se mueve muy lentamente o demasiado rápido a través de la aguja. Si la sangre se extrae con una jeringa, al sacar el embolo con fuerza o al inyectar la sangre en los tubos usando presión en el embolo, generalmente se produce hemólisis. En forma similar, el flujo de sangre lento de una vena colapsada que es depositado a un tubo con vacío a menudo produce una muestra hemolizada. La turbulencia en un tubo conteniendo sangre también puede causar hemólisis después de haber terminado la colecta; los transportadores mecánicos y centrífugas en mal estado son causas raras de hemólisis.

La hemólisis altera los resultados de las pruebas de laboratorio. De manera importante el contenido de los glóbulos rojos es liberado, incrementando la concentración de sustancias intracelulares tales como lactato deshidrogenasa (LDH), potasio y magnesio, mientras que disminuye la concentración de solutos extracelulares como el sodio. (6)

Contaminación con fluidos intravenosos

A muchos de los pacientes hospitalizados, por prescripción médica se les administra fluidos intravenosos, los cuales típicamente tienen una concentración más alta de glucosa, drogas y algunos electrolitos, que los que están presentes en la sangre. La contaminación con fluidos intravenosos ocurre, cuando la sangre es extraída de una vena conectada a la vena que tiene el catéter. Aunque pudiera parecer que una vena en el antebrazo es suficientemente distante del catéter, hay una gran cantidad de interconexiones. Cualquier extracción de sangre de una vena que se encuentre en el mismo lado donde está instalado un catéter, corre el riesgo de experimentar contaminación por fluidos. (6)

c) Errores relacionados con la identificación del paciente y la muestra correspondiente.

Debido a que no hay forma de probar que una muestra sin etiqueta pertenece a un paciente dado, resulta esencial la identificación apropiada de las muestras. Mientras que el etiquetado puede parecer la parte más simple de la colecta de muestras, en la mayoría de los laboratorios es la causa más común de resultados erróneos. Muchos errores se cometen cuando se etiquetan muestras de pacientes con nombres similares (6)

3. Causas de Variación Posteriores a la Recolecta

Las causas de variación posteriores a la recolecta son más fácilmente controladas por el laboratorio que las variaciones relacionadas con la flebotomía, ya que es posible desarrollar criterios para las condiciones aceptables de almacenamiento y manejo de muestras después de la colecta, durante el tiempo que las muestras están en posesión del laboratorio. Dentro de las variables en el

manejo de muestras que afectan los resultados de las pruebas están: transporte, separación del suero de los elementos celulares y las condiciones de almacenamiento. ⁽⁶⁾

Transporte de las muestras

Errores relacionados con el transporte de muestras.

Comúnmente las muestras son transportadas por los flebotomistas o por los mensajeros. Una tardanza razonable en la transportación, por lo general es bien tolerada por la mayoría de los compuestos analizados, ya que los cambios metabólicos ocurren relativamente despacio a temperatura ambiente. Así, la tardanza hasta de una hora no cambia la concentración de la mayoría de los compuestos analizados. La glucosa, a menudo considerada una de las sustancias más lábiles en la sangre disminuye de 2 a 3% por hora, a temperatura ambiente, en tubos sin inhibidores glucolíticos como el fluoruro. Los productos del metabolismo (como lactato, amonio y el ion hidrógeno) se acumulan en el plasma después de la toma de la muestra, a menos que las reacciones enzimáticas sean retardadas. ⁽⁶⁾

Procedimiento para minimizar errores de transportación

Para minimizar la variación posterior a la colecta, los especímenes deben ser entregados y almacenados rápidamente después de la toma de muestras. Los compuestos analizados que están sujetos a cambios de concentración in vitro a temperatura ambiente, inmediatamente deben ser transportados en hielo al laboratorio. Las instrucciones de manejo deben ser claras; en muchos casos, las muestras son colocadas incorrectamente sobre hielo, transportadas sobresaliendo de un recipiente con hielo o sumergidas en hielo sin agua. Debido a que un sólido conduce calor más lentamente que un líquido, las muestras manejadas de esta manera, no se enfriarán tan rápido y pueden mostrar cambios en la concentración del compuesto analizado.

Aunque el enfriamiento de las muestras durante su transporte minimiza muchos cambios artificiales en la concentración de compuestos analizados, el enfriamiento también incrementa la liberación de potasio de las células.

Para una sustancia que sufre cambios en la concentración debidos al metabolismo in vitro, debe indicarse un tiempo específico tolerable de retraso. ⁽⁶⁾

Procesamiento de muestras

Errores originados debido al procesamiento incorrecto de las muestras

La centrifugación es el método más comúnmente usado para la separación inicial del suero y las células. En general, la centrifugación de muestras por 5 a 10 minutos a 1000-2000 G es adecuada para la completa separación del suero y eritrocitos, incluyendo las muestras que contienen geles separadores de suero o plasma. Las muestras para obtener suero deben ser centrifugadas únicamente hasta que la formación del coágulo sea completa (al menos 20 a 30 minutos después de su colecta). Se debe tener la precaución de revisar que realmente el coágulo se haya formado, ya que puede haber razones fisiológicas para que

ocurran tiempos prolongados de formación del coágulo. Por ejemplo, las muestras de pacientes de diálisis pueden continuar coagulándose por horas después de la colecta debido a la heparina empleada en la preparación de los pacientes para diálisis. Con tubos que no contienen geles separadores, es necesaria una etapa adicional para completar la separación. Antes de la centrifugación, los objetos tales como perlas de vidrio, tapones o cualquier otro objeto mecánico puede ser adicionado a los tubos para realizar la misma función que el gel. El suero debe ser separado de las células, de otra manera, las células sanguíneas continuarán llevando a cabo sus funciones metabólicas y alterarán la composición del espécimen. (6)

Almacenamiento de muestras

Errores originados debidos al almacenamiento inadecuado de muestras

Una vez que el suero o plasma ha sido separado de las células, la mayoría de las sustancias en un período de 2-3 días muestran pequeños cambios en la concentración cuando se mantienen a 4 °C. Para compuestos analizados lábiles, incluyendo, enzimas y algunas otras sustancias, las muestras deben ser congeladas para prevenir cambios relacionados con el almacenamiento. Los compuestos analizados que pueden ser intrínsecamente estables en almacenamiento, también pueden cambiar en presencia de otros compuestos.

La evaporación puede incrementar la concentración de la muestra. Cuando una muestra no está cubierta, la velocidad de evaporación es afectada por la temperatura, humedad, movimiento del aire y el área superficial de la muestra. (6)

Procedimientos para minimizar errores por almacenamiento.

Los errores por almacenamiento pueden ser evitados seleccionando adecuadamente la hora, la temperatura y las condiciones de almacenamiento. La mayoría de los compuestos analizados son estables, cuando se almacenan refrigeración durante 72 horas. Si un compuesto analizado no es estable, las muestras deben ser congeladas, hasta su análisis. La mayoría de especímenes pueden almacenarse a -70 °C sin que sean afectadas las concentraciones de los compuestos analizados, más que cuando sean congelados por varios años. A las temperaturas estándares de congelación de -10° a -20° C, la mayoría de las sustancias serán estables por períodos más cortos. Debe evitarse la descongelación y recongelación repetidas de muestras; esto es especialmente problemático con los congeladores modernos "libres de escarcha", los cuales periódicamente incrementan la temperatura de congelación para permitir la fusión de la escarcha. Los compuestos analizados que son susceptibles a ciclos repetidos de congelación y descongelación, como el complemento, deberán ser almacenados en otro tipo de congeladores. Las muestras congeladas deben ser descongeladas lentamente a temperatura ambiente o en un baño de agua a 37 °C, y entonces ser mezcladas meticulosamente antes de su análisis. (6)

Criterio para el rechazo de especímenes

Para evitar el reporte de resultados falsos, cada laboratorio debe establecer el criterio para el rechazo de especímenes. Un espécimen debe ser rechazado cuando los resultados obtenidos en su análisis no representan el estado del paciente. La causa más común de rechazo de un espécimen se origina por una identificación inadecuada. Los especímenes debe tener el nombre del paciente y número de identificación tanto en la muestra como en la requisición. Los especímenes que no son extraídos por el personal del laboratorio deberán ser cuidadosamente revisados antes de ser aceptados en el laboratorio. En especímenes que requieren manejo especial, las causas más comunes de rechazo son la colecta y/o transporte inadecuado.

Cada laboratorio deberá tener una lista de muestras alternativas aceptables para cada prueba; por ejemplo, el manual del laboratorio puede sugerir la colecta de suero para una prueba en particular, pero una muestra de plasma heparinizado puede ser una alternativa aceptable. Si las muestras contienen otros anticoagulantes o preservativos, deben ser rechazadas (aunque sean útiles para otros análisis). Cuan las muestras se manejen en tubos que contienen anticoagulantes o preservativos, se indicará la proporción hay entre los mismos . Esto es más crítico con preservativos en soluciones líquidas, pero puede ocurrir también con anticoagulantes en polvo. Los tubos que no tengan la proporción apropiada no deben ser aceptados para análisis. Para pruebas que requieren una preparación especial del paciente y si ésta no se llevó a cabo, las muestras deben ser rechazadas. Si una prueba es afectada por hemólisis, los especímenes hemolizados deben rechazarse. Así mismo, si el resultado de una prueba es afectado por lipemia (y la muestra no puede ser clarificada por ultra centrifugación antes del análisis), este resultado de la prueba no deberá ser reportado. Aunque muchos médicos se quejen cuando el laboratorio no les reporta el resultado de las pruebas que solicitaron para sus pacientes, si hay alguna duda a cerca de la validez de un resultado este no debe ser reportado. Los resultados erróneos pueden conducir al tratamiento inadecuado del paciente. (6)

1.2 ETAPA ANALÍTICA

En la fase analítica se realizan las mediciones y observaciones en función de los procesos o protocolos que cubre el laboratorio. Cada procedimiento de análisis describirá no sólo las mediciones y observaciones implementadas en el laboratorio, sino también la verificación de las características de ejecución, que pretende la persona que elaboró el procedimiento o el fabricante del sistema analítico. Los procedimientos, materiales de sistema de control, varían según la especialidad. Algunas veces los valores obtenidos son variables continuas (método cuantitativo), en otros casos las variables son discretas (semi-cuantitativas y cualitativas), pero en todos los casos, en la fase analítica se debe considerar la medición u observación y un procedimiento de control. La selección del procedimiento se basa en los criterios de practicabilidad y confiabilidad. Los aspectos de practicabilidad incluyen la educación y el entrenamiento requerido, disponibilidad de reactivos, los requerimientos instrumentales, el tiempo de

ejecución, el costo y la seguridad. El personal encargado de elaborar los procedimientos con base en un estándar de operación, debe cuidar estos aspectos al igual que la industria que los adapte a su versión comercial y es importante tomarlos en cuenta antes de seleccionar un procedimiento que se vaya a implementar en el laboratorio. Los criterios de confiabilidad describen la ejecución analítica del método cuando se utiliza en condiciones rutinarias y son los siguientes: la exactitud en la ejecución, la precisión (expresada como una desviación estándar o coeficiente de variación), la veracidad (expresada como desviación), la linealidad, la especificidad analítica, la interferencia analítica, el límite de detección, el intervalo de medición y el error total. Las características anteriores pueden variar de un laboratorio a otro, ya que la implementación de cada uno de ellas modifica las condiciones óptimas. La etapa o fase analítica en química clínica, también incluye otros aspectos como son: la calibración, los estándares de calibración, los métodos de medición, la capacidad de rastrear los resultados para validarlos, los cálculos para los resultados, la utilización de curvas de medición, el uso de relaciones teóricas para algunas magnitudes, las transformaciones de resultados para hacerlos más informativos al médico, el uso de computadoras y analizadores, los procedimientos que permiten monitorear la ejecución de un procedimiento de medición con el propósito de una acción correctiva, el uso de materiales o sueros control y la preparación del mismo, el establecimiento de los límites de control, la realización de gráficas de control, la interpretación de las mismas, el uso de reglas de control, el archivo de todo lo relativo al control de calidad para posteriores requerimientos, entre otros aspectos.⁽⁷⁾

1.3 POST-ANALÍTICA

La preservación de la calidad post-analítica es el proceso para verificar la calidad en todos los procedimientos que se llevan a cabo cuando el reporte sale del laboratorio y queda en manos del médico o profesional al cuidado de la salud. Además de utilizar intervalos de referencia correctos, las áreas de preservación de la calidad post-analítica incluyen:

- ✓ Verificación de los cálculos en los reportes finales.
- ✓ Revisión de los resultados de la prueba para detectar posibles errores de transcripción.
- ✓ Que los reportes sean fáciles de leer e interpretar.
- ✓ Procedimientos para informar al médico de resultados que requieran de atención inmediata.
- ✓ Vigilar que se reporten en el momento preciso los valores en el expediente del paciente.
- ✓ Verificar que el médico interprete en forma correcta las pruebas de laboratorio.
- ✓ Mantener una interacción constante con el personal responsable de la institución, con el fin de asegurar que el paciente reciba cuidados directos de buena calidad como resultado de las pruebas de laboratorio.

En general, la vigilancia de esta parte de la preservación de la calidad se realiza de dos maneras. Estas observaciones suelen relacionarse con reportes de

laboratorio incorrectos o con que transcurre demasiado tiempo, desde que se solicita la prueba de laboratorio hasta que se reciben los resultados finales. El otro tipo de vigilancia de la calidad en esta área, se practica mediante la valoración continua del impacto de los resultados y procedimientos del laboratorio dentro de la institución en la cual brinda sus servicios. El objetivo de estas valoraciones continuas es promover la excelencia en los cuidados para los pacientes, por medio de las relaciones humanas con todos los departamentos de la institución. Los programas de preservación de la calidad a nivel institucional toman la forma de círculos de calidad, comités para preservación de la calidad o comités revisores. El objetivo de estos grupos no es resolver problemas sino evitar que ocurran. Además es necesario que el laboratorio tenga algún método para preservar en forma continua la calidad, verificando periódicamente su capacidad para funcionar como un departamento de buena calidad. Esto puede incluir la evaluación de los espacios disponibles en el laboratorio para asegurar eficacia en los servicios, revisar el grado de preparación del personal y apoyarlo, para que participe en actividades de actualización de conocimientos y continuar con su formación profesional.

Todos los miembros del personal de laboratorio son responsables de que se preserve la calidad dentro del mismo. Esto será una forma de convivencia y una actitud evidente en todos los niveles de práctica. La calidad debe extenderse más allá de los confines físicos del laboratorio e incluye la responsabilidad de los servicios hacia cualquier médico que ordene una prueba y una preocupación permanente para que el paciente reciba tratamiento eficaz como resultado de los datos que arroja el laboratorio.⁽⁵⁾

Una vez que se propicie un aseguramiento de la calidad de los estudios en cada una de las etapas anteriores, se podrán obtener resultados concretos respaldados con bases sólidas, es decir, se podrá afirmar entonces que se tiene un laboratorio con la adecuada estructura operativa y administrativa.

1.4 FLEBOTOMÍA

PUNCIÓN VENOSA

1.0 INTRODUCCIÓN

La flebotomía constituye una de las etapas más importantes en el trabajo del laboratorio clínico. Por una parte representa el primer contacto entre el laboratorio y sus pacientes, y respecto a la muestra sanguínea: la enorme importancia que conlleva una muestra apropiadamente colectada, la seguridad de su origen, y el correcto envasado y transporte constituyen factores fundamentales en la evaluación e informe de los exámenes a realizar.⁽¹¹⁾

El organismo utiliza la sangre para el transporte de oxígeno, alimento, residuos y otros materiales que hay en el interior del cuerpo, y también para regular la temperatura corporal, los líquidos y el equilibrio ácido básico. Debido a las múltiples funciones de la sangre dentro del cuerpo, los exámenes de ésta o de sus componentes pueden suministrar indicios claves para el diagnóstico de muchas condiciones médicas.

La sangre está compuesta de una porción líquida (plasma) y de una porción celular; el plasma contiene varias sustancias que están disueltas en el líquido. El suero es lo que queda, cuando el fibrinógeno se ha separado del plasma (líquido que queda después de que se deja coagular la sangre en un tubo de ensayo). La porción celular de la sangre consta principalmente de glóbulos rojos, pero también tiene glóbulos blancos y plaquetas.⁽⁸⁾

Los tubos al vacío han reemplazado a las jeringas. Estos tubos pueden estar siliconados para evitar la hemólisis de la muestra, vienen preesterilizados por irradiación y presentan tamaños de 2 a 30 mL. Durante la recolección de la sangre y hasta que el suero es separado de los glóbulos rojos, debe reducirse la posibilidad de hemólisis (utilizando agujas de calibre adecuado, tubos limpios y secos, un mezclado suave, etc.) ya que la hemólisis produce la elevación *in vitro* de la concentración de los metabolitos del suero, al liberarse estos de los eritrocitos, p.ej. fósforo, sodio, hemoglobina, proteínas totales, lípidos, enzimas, bilirrubinas, etc., también puede provocar un efecto de dilución de los componentes químicos del suero, al liberarse sustancias del interior de los eritrocitos.⁽⁹⁾

Si se toma varias muestras de sangre, con tubo al vacío y una sola punción venosa hay que tener precaución de poner los tubos en un orden definido para evitar la contaminación cruzada entre tubos.

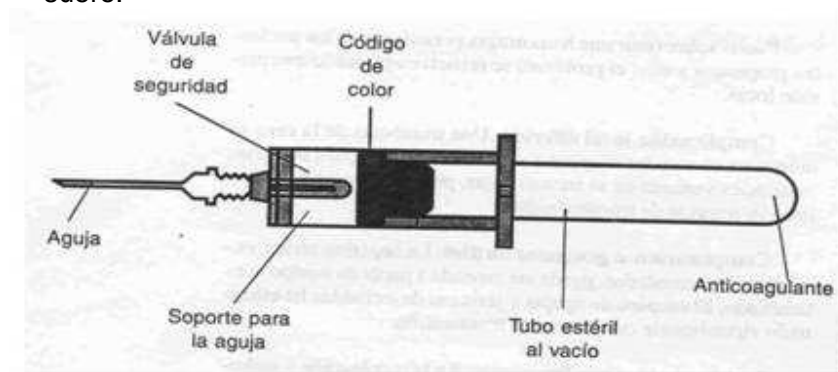
El orden recomendado de la toma, cuando se efectúa una recolección múltiple de muestras es el siguiente:

- ✓ Tubos sin anticoagulante (Rojo).
- ✓ Tubos para pruebas de coagulación. (Azul).
- ✓ Tubos con otros anticoagulantes (Lila, Verde, Verde-Gris y Amarillo).⁽¹⁰⁾

Cuadro I

TUBOS DE FLEBOTOMÍA Y SU APLICACIÓN

| Muestras | Tipo de Anticoagulante | Color del tapón | Bases químicas | Aplicación |
|---------------------------------|------------------------|---------------------|--|----------------------------------|
| Tubos de flebotomía | | | | |
| Plasma. | Citrato. | Azul. | Captura calcio. | Coagulación. |
| Plasma. | EDTA. | Lila. | Captura calcio. | Hematología. |
| Plasma. | Heparina. | Verde. | Inhibe trombina. | Química. |
| Plasma. | Citrato. | Negro. | Captura calcio. | Coagulación. |
| Agentes antiglucolíticos | | | | |
| Suero. | Yodoacetato. | Gris. | Inhibe la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. | Glucosa, ácido lactico |
| Plasma parcial. | Fluoruro. | Gris. | Inhibe la enolasa. | Glucosa. |
| Tubos especiales | | | | |
| Suero. | Ninguno. | Azul. Brillante. | Libre de contaminantes. | Oligoelementos, metales pesados. |
| Suero. | Ninguno. | Marrón. | Libre de plomo. | Plomo. |
| Suero. | Separador de suero. | Gris/rojo. | Barrera de gel. | Química. ⁽¹⁰⁾ |



Sistema de tubo colector⁽⁹⁾

CUADRO 1

2.0 OBJETIVOS

- ✓ Definir y realizar los procedimientos necesarios para minimizar los errores en la toma de muestras.
- ✓ Definir y aplicar adecuadamente el procedimiento para la punción venosa.

- ✓ Validar la enorme importancia para obtener una muestra apropiadamente colectada, su correcto envasado y transporte.
- ✓ Realizar la punción venosa entre los alumnos y utilizar el modelo brazo mecánico para manejo de material utilizado en la puncción

3.0 MATERIAL

Para desinfectar la piel:

- ✓ Alcohol isopropílico al 70%.
- ✓ Algodón.
- ✓ Gasas.

Para punción de la vena

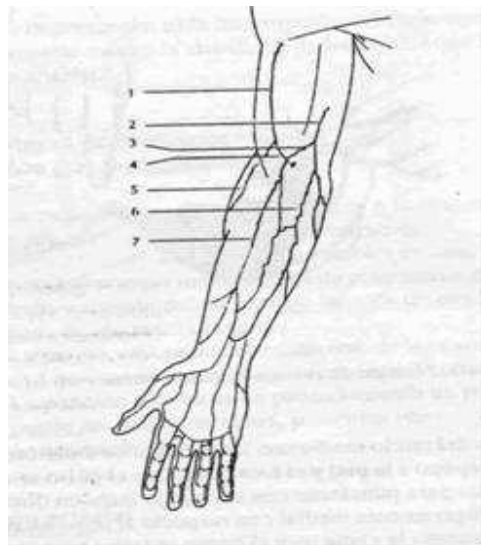
- ✓ Ligadura de goma de látex (2-5 mm de diámetro por 35-40 cm. de largo).
- ✓ Tubos al vacío correctamente identificados.
- ✓ Soporte para tubos VACUTAINER
- ✓ Agujas desechables estériles calibre 20, 19 o 18.⁽⁹⁾
- ✓ recipiente para desechos punzo cortantes
- ✓ bolsas rojas para desechos biológicos

4.0 CONDICIONES DE LA TOMA DE MUESTRA DE SANGRE VENOSA

- ✓ Es necesario que la persona que va a tomar la muestra adopte actitud de confianza, autoseguridad y equilibrio. Conocer y realizar los procedimientos necesarios para minimizar los errores en la toma de muestras.
- ✓ Debe explicar brevemente al paciente las maniobras que va a realizar para obtener la mayor colaboración posible. Debe tranquilizarse al paciente para disminuir el estado de estrés.
- ✓ Revisar que todo el material esté listo (tubos rotulados, torundas de algodón, alcohol, ligaduras, jeringa, gradilla, tapones).
- ✓ El paciente y el operador deben estar en posición confortable y en un sitio con buena iluminación.
- ✓ El paciente debe estar sentado en una silla y debe extender el brazo sobre el borde de una mesa, encima de una toalla desechable, para tener acceso fácil y cómodo a la fosa antecubital. Evitar el uso de bancos altos sin respaldo.
- ✓ Es necesario tener en cuenta el tipo de análisis, el volumen de la muestra y la edad del paciente.

- ✓ Para volúmenes pequeños de muestra es recomendable utilizar el lóbulo de la oreja, pues en caso de utilizar los dedos de la mano se corre el riesgo de infecciones por contaminación en el trabajo de laboratorio.
- ✓ Para un volumen mayor, el sitio más adecuado es la vena que se encuentra en el pliegue anterior de la flexión del codo, se recomienda utilizar la **vena mediana basilica o cefálica ver la Figura1**
- ✓ En los pacientes obesos las venas que se observan azulosas son demasiado superficiales y pequeñas y es mejor no utilizarlas.
- ✓ Es conveniente que el paciente no mire mientras se está realizando la punción.⁽⁹⁾

5.0 SELECCIÓN DEL SITIO DE PUNCIÓN FIGURA 1



VENAS SUPERFICIALES DEL BRAZO

1. V. Cefálica.
2. V. Basilica.
3. **V. Media basilica.**
4. **V. Mediana cefálica.**
5. V. Radial accesoria.
6. V. cubital superficial.
7. V. Radial superficial.⁽⁹⁾

6.0 PROCEDIMIENTO PARA LA PUNCIÓN VENOSA

6.1 DESARROLLO DE LA PRÁCTICA:

1. Verificar que las etiquetas coincidan con la solicitud de las pruebas.
2. Se identifica al paciente comprobando su nombre completo y fecha de nacimiento. Si se encuentra inconsciente, debe verificarse su identidad a través de una enfermera o un familiar. No se debe extraer muestra alguna sin identificar adecuadamente al paciente.
3. Si se solicita una muestra en ayunas, debe comprobarse que el paciente no ha ingerido alimentos. Hay que dirigirse al paciente e informarle sobre el procedimiento.
4. Se debe colocar adecuadamente al paciente, según se encuentre sentado o en decúbito prono, para tener acceso fácil a la fosa antecubital.
5. Se debe preparar todo el material, incluidos los tubos, la ligadura, los objetos para limpiar la piel, las jeringas; cuando sea necesario, la aguja estéril y el dispositivo para fijarla.
6. Se solicita al paciente que cierre el puño para que las venas resulten más palpables.
7. Se selecciona la vena adecuada para la punción (fig. 1)
8. Se limpia la zona de la punción con una torunda humedecida con alcohol isopropílico al 70%. Se comienza en el punto de la punción y se prosigue la limpieza hacia fuera siguiendo un movimiento espiral.
9. Se aplica un torniquete varios centímetros por encima de la zona de punción. No dejarlo más de un minuto.
10. Se fija la vena tanto por encima como por debajo del lugar de punción, con ayuda de los dedos pulgar y medio o índice y pulgar.

Se realiza la venopunción: a) se penetra la piel con la aguja formando un ángulo de 15° con el brazo y con el bisel hacia arriba, se sigue la dirección de la vena; b) se introduce la aguja con suavidad pero con rapidez para reducir las molestias. No hay que “enterrar” la aguja; c) si se utiliza una jeringa , se tira hacia atrás del émbolo, con tensión lenta y uniforme a medida que la sangre va fluyendo en su interior; d) si se utiliza un tubo al vacío, en cuanto la aguja haya penetrado en la vena se dirigirá el tubo todo lo posible hacia delante apoyándose en el dispositivo de sujeción (de la misma forma en que se introduce el émbolo de una jeringa). Al mismo tiempo mantenga firmemente la aguja en su lugar. Una vez que se haya llenado el tubo, se retira cogiéndolo por su extremo y tirando suavemente de él. Se mezcla la sangre con el anticoagulante por inversión suave. Si la muestra ha sido extraída con jeringa se transferirá la sangre a los tubos correspondientes después de retirar la aguja.

7.0 CRITERIOS DE LABORATORIO PARA ESPECÍMENES INACEPTABLES

Las causas más frecuentes de rechazo de especímenes sanguíneos son:

1. **Identificación inadecuada.** Cada laboratorio debe determinar la cantidad mínima de información del paciente que debe ser incluida en la solicitud de laboratorio y en el recipiente de la muestra. Esta información incluye generalmente nombre, dirección, habitación, número de identificación, sexo , edad. El flebotomista debe verificar visual y verbalmente la identidad del

paciente, comparando su nombre con el de la pulsera de identificación, la prueba requerida y las etiquetas. El tubo y la solicitud de laboratorio deben volverse a controlar para verificar su identidad luego de ser recibidos. Las diferencias entre el nombre de la solicitud del laboratorio y el envase de la muestra es causa de rechazo de ésta.

2. **Volumen de sangre inadecuado recogido en tubos o jeringas con aditivo.** La cantidad de aditivo adicionada a un tubo al vacío presupone que éste se llenará totalmente con sangre. Si se extrae menos sangre de la requerida, la cantidad excesiva de aditivo tiene el potencial de afectar adversamente la exactitud de los resultados de las pruebas. El EDTA y citrato de sodio para hematología y coagulación son inaceptables con menos del 100% del llenado del tubo. No se han investigado recomendaciones de tolerancia absoluta para otros aditivos. Hasta ahora, el lineamiento solamente puede alterar sobre los posibles efectos perjudiciales de los aditivos en exceso.
3. **Utilización de tubos de recolección inadecuados.** En general, el suero es la muestra preferida para la mayoría de los análisis bioquímicos. Los tubos de fluoruro de sodio diseñados para la muestra de glucosa son inapropiados para la mayor parte de los otros procedimientos. Los agentes quelantes son inaceptables para las determinaciones enzimáticas la mayoría de la veces. La heparina es tal vez el anticoagulante que menos afecta los procedimientos de laboratorio, aunque esto depende en gran parte del método.
4. **Hemólisis.** La hemólisis puede ser el resultado de una venipuntura difícil o de un manejo impropio del espécimen recolectado. La hemólisis también puede resultar de un proceso de la enfermedad que causa la destrucción intravascular de los eritrocitos. La hemólisis visible es inaceptable (mayor a 200 mg/L de hemoglobina) cuando se analizan estas sustancias utilizando ciertos métodos. El grado de interferencia depende del grado de hemólisis, la concentración de la variable analítica y la metodología empleada.
5. **Transporte inapropiado.** Las muestras para determinación de ácido láctico, gases en sangre, amonio y otros procedimientos donde existe una significativa susceptibilidad de éstas al deterioro, no deben ser analizadas si no son transportadas al laboratorio en hielo y dentro de un tiempo preestablecido.
6. **Tiempo preanalítico permisible.** Cuando el tiempo máximo permisible es excedido, deben tomarse medidas. La falsificación de los resultados será asumida médicamente. El responsable del laboratorio marcará el resultado obtenido con una nota apropiada, o se negará a llevar a cabo la prueba. La última medida es especialmente aconsejable cuando la conclusión médica

puede deducirse del resultado, lo cual es una desventaja para el paciente.(9)

1.5 ESTUDIO DE LA VARIACIÓN EN CONDICIONES DE RUTINA (VCR)

1.0 INTRODUCCIÓN

Todos los laboratorios de salud deben tener un sistema para valorar la calidad de su trabajo. La experiencia ha demostrado que entre los laboratorios que han aceptado esta recomendación, existen muchos que han elegido métodos de ensayo de la variación de los resultados que persiguen más la satisfacción y la seguridad que la información veraz y completa sobre su calidad.

Existen tres posibles causas de variación en el laboratorio de la salud. Una de ellas es la debida a errores al azar. Como ejemplos pueden citarse:

- ✓ Error en la lectura de los instrumentos.
- ✓ Errores aleatorios en los cálculos.
- ✓ Errores de transcripción incluyendo la transposición de números.
- ✓ Colocación incorrecta de la coma decimal.
- ✓ El uso de un espécimen incorrecto del paciente debido al intercambio de especímenes.
- ✓ El uso de un reactivo o patrón preparado incorrectamente.

Las otras dos causas de variación son la precisión: concordancia entre los resultados de una serie de mediciones. Y la exactitud: concordancia entre la medida de una serie de mediciones y el valor verdadero.

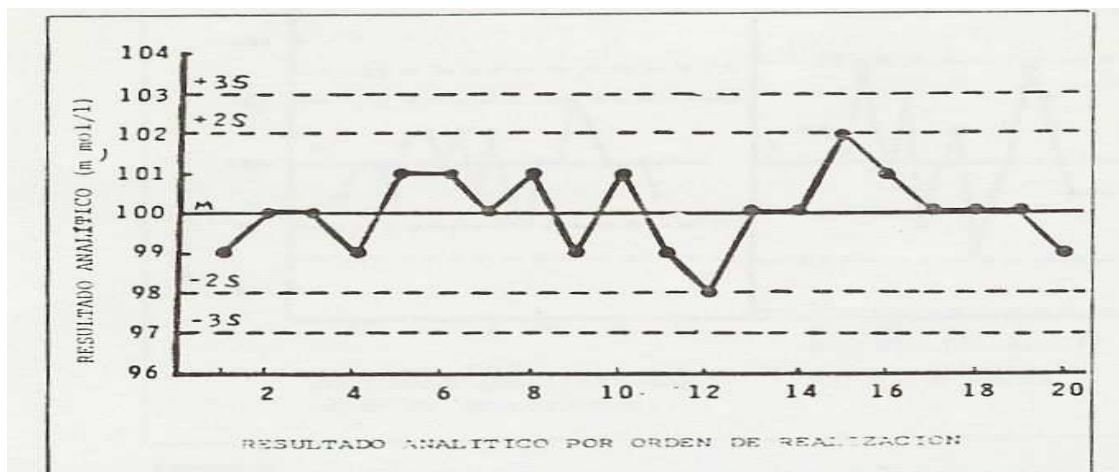
VARIACIÓN EN CONDICIONES ÓPTIMAS:

La variación de las condiciones óptimas (VCO) es la menor variación que puede obtenerse para un método analítico concreto en un laboratorio individual.

Deben realizarse aproximadamente 20 análisis para obtener la (VCO). El objetivo es intentar repetir los análisis en las condiciones analíticas tan ideales y constantes como sea posible. Han de aplicarse estrictamente todas las medidas preventivas necesarias. Algunas son:

- ✓ Usar el mismo aparato para todas las determinaciones.
- ✓ Usar reactivos recién preparados y verificados.
- ✓ Realizar los análisis sobre un material homogéneo y estable.
- ✓ Verificar las lecturas del instrumento y los cálculos.
- ✓ Realizar los análisis en el menor intervalo de tiempo posible.
- ✓ Controlar cuidadosamente la temperatura y el tiempo.
- ✓ Evitar cambios bruscos en las condiciones ambientales; luz, temperatura, humedad.
- ✓ Asegurarse de que todos los reactivos están correctamente mezclados.
- ✓ Utilizar personal experimentado.⁽¹³⁾

En resumen en el tratamiento de los resultados deben calcularse la media y la desviación estándar y más importante aún, deben representarse gráficamente los resultados individuales en una gráfica control como lo indica la siguiente gráfica :



Gráfica de control en óptimas condiciones de variación. (M: media ; S: desviación estándar).

En esta gráfica de control se han trazado cinco líneas horizontales, una corresponde al valor medio de los valores observados, y dos líneas por encima y dos por de bajo de la media correspondiendo a dos y tres desviaciones estándar de la media.

En la valoración de la VCO deben buscarse tendencias y anomalías en la distribución de los resultados, buscar su causa y resolver el problema antes de pasar al siguiente nivel.⁽¹³⁾

VARIACIÓN EN CONDICIONES DE RUTINA:

Otra etapa en las técnicas de control de calidad es determinar la varianza en condiciones de rutina (VCR). Esta es la variación de los resultados de una técnica cuando el material es analizado en condiciones de trabajo similares a las que se encontrará cotidianamente.

Este tipo de control consta de dos partes. La primera se refiere al análisis del material de control cuando previamente se conocen los valores del mismo (VCRC). La segunda se refiere al análisis de materiales cuyos valores no son conocidos (VCRN).

Con frecuencia la variación en condiciones de rutina será mayor que la obtenida en condiciones óptimas. Para la mayoría de las técnicas colorimétricas la razón entre ambas variaciones es de 2. Esto se debe a la dificultad de mantener las condiciones analíticas en situación totalmente estable durante un período prolongado de tiempo en condiciones de rutina.

Dentro de la variación en condiciones de rutina con valores desconocidos deben tomarse en cuenta tres componentes esenciales:

- ✓ Utilizar más de un nivel de concentración del material de control.
- ✓ Asegurarse de que los valores "esperados" son desconocidos para el operador.
- ✓ Colocar el material de control al azar dentro de las series de análisis de la misma forma en que se colocan los sueros de los pacientes.⁽¹³⁾

Para el estudio de la variación en condiciones de rutina se utilizará la determinación cuantitativa de albúmina.

La albúmina tiene varias funciones en el torrente sanguíneo incluyendo nutrición, mantenimiento de la presión oncótica y transporte de sustancias como Ca^{++} , bilirrubina, ácidos grasos, drogas y esteroides.

Valores bajos en suero pueden resultar de mal nutrición en enfermedades del hígado, un incremento en el catabolismo, incremento en la excreción en, orina o heces, o un cambio de distribución entre los compartimientos intravascular y extravascular. Valores altos en suero pueden resultar de deshidratación o quemaduras severas.⁽⁵⁾

2.0 OBJETIVOS

- ✓ Proporcionar resultados de análisis con exactitud y con precisión, de tal manera que se puedan obtener conclusiones y tomar decisiones basadas en una información que tenga niveles aceptables de error.
- ✓ Realizar 20 repeticiones de una muestra control comercial determinando proteína o cualquier analito en condiciones de rutina y determinar el coeficiente de variación que debe ser menor a 5%. El analito a evaluar se le informará al alumno antes de la práctica.
- ✓ analizar estadísticamente los resultados obtenidos de la misma muestra para establecer el grado de precisión y exactitud.
- ✓ Determinar las fuentes de variación analítica más frecuentes en el trabajo del laboratorio.
- ✓ Manejar e interpretar adecuadamente las cartas control de Levey-Jennings.

GRÁFICAS Y CARTAS DE CONTROL :

Cada equipo reportará los resultados obtenidos en el procedimiento de la determinación de albúmina en el pizarrón.

Los datos de los controles de cada equipo representaran los análisis diarios de las mezclas de control de calidad de un laboratorio (cada equipo representara un día diferente de un mes). A partir de los datos reportados:

- ✓ Calcule la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación de sus resultados.
- ✓ Grafique sus resultados en las cartas control de Levey-jennings, resaltando los límites de alerta ($\bar{x} \pm 2s$).

Realizar la carta de control de calidad:

NOMBRE _____
MATERIA _____ EQUIPO _____ FECHA _____
COMPONENTE _____
METODO _____ UNIDADES _____
LONGITUD DE ONDA _____ nm. APARATO _____

(SIGUIENTE TABLA 1)

tabla1

| FECHA | No. DE DETERMINACIONES | VALORES INDIVIDUALES X_i | DESVIACIONES DEL VALOR MEDIO $X_i - \bar{X}$ | CUADRO DE LAS DESVIACIONES $(X_i - \bar{X})^2$ |
|-------|------------------------|----------------------------|--|--|
| | 1 | | | |
| | 2 | | | |
| | 3 | | | |
| | 4 | | | |
| | 5 | | | |
| | 6 | | | |
| | 7 | | | |
| | 8 | | | |
| | 9 | | | |
| | 10 | | | |
| | . | | | |
| | . | | | |
| | . | | | |
| | . | | | |
| | . | | | |
| | . | | | |
| | . | | | |
| | . | | | |
| | . | | | |
| | . | | | |
| | . | | | |
| | . | | | |
| | . | | | |
| | . | | | |
| | . | | | |
| | . | | | |
| | 25 | | | |
| | $n =$ | $\Sigma X_i =$ | | $\Sigma (X_i - \bar{X})^2$ |

Calculado el: _____ Firma: _____

¿Cuál sería su conclusión, respecto de la precisión con la que se trabaja en el laboratorio?

Límites de alerta { Superior $\bar{x} + 2s$
Inferior $\bar{x} - 2s$

Limites de control { Superior $\bar{x} + 3s$
Inferior $\bar{x} - 3s$

Realizar grafico de Levey-Jennings:

NOMBRE _____

MATERIA _____ EQUIPO _____ FECHA _____

COMPONENTE _____

MÉTODO _____ UNIDADES _____

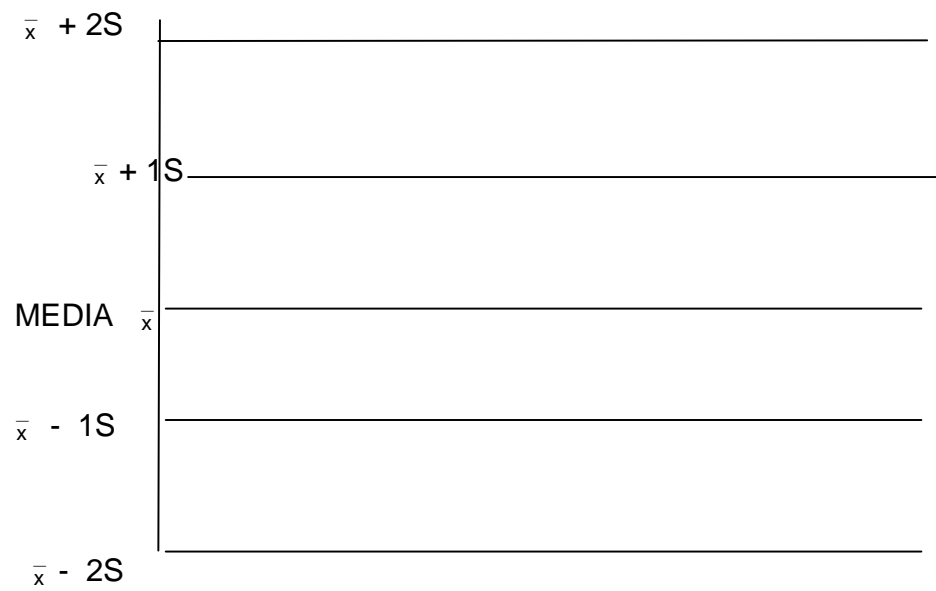
LONGITUD DE ONDA _____ APARATO _____

DATOS DEL CONTROL UTILIZADO:

MARCA: NIVEL: LOTE: CADUCIDAD:

(SIGUIENTE GRÁFICO 2)

Gráfico 2 de Levey-Jennings



UNIDAD II

2. PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO RENAL

2.1 ÁCIDO ÚRICO

Método enzimático – colorimétrico

1. INTRODUCCIÓN

El ácido úrico en los mamíferos es el metabolito final del catabolismo de las bases púricas y su elevación está asociada a la gota, es decir, los reumatismos hiperuricémicos. En los pacientes con tal disfunción, aparecen cristales de ácido úrico en las articulaciones y en los tendones, lo que origina las manifestaciones reumáticas características.

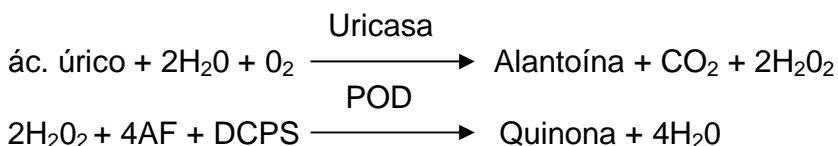
Niveles altos de ácido úrico están también asociados a patología renal por retención de productos nitrogenados, asociándose en estos casos a valores también altos de urea y de creatinina.

2. OBJETIVO

- ✓ Aplicar el manejo adecuado de la técnica para la determinación de ácido úrico en una muestra biológica.
- ✓ Establecer los valores de referencia de ácido úrico y comparar con el valor de nuestra muestra problema a analizar.
- ✓ Definir cuales son las principales patologías que se presentan si tenemos valores altos o bajos de ácido úrico en una muestra biológica.

3. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El ácido úrico es oxidado por la uricasa a alantoína y peróxido de hidrógeno que en presencia de POD y 4-AF y DCPS forma un compuesto rosáceo.



4-AF = 4 aminofenazona

DCPS = 2,4,diclorofenol sulfonato

Guardar en refrigeración a 2-8 °C. Estos productos son, solamente, para uso de laboratorio y pruebas "in vitro".

4. PREPARACIÓN

4.1 MUESTRA CLÍNICA

MUESTRA

Suero, plasma u orina.

Orina: Diluir la orina al 1:10 con agua destilada, mezclar y seguir la técnica.

Multiplicar el resultado por 10.

4.2 REACTIVOS Y MATERIAL

1 Micropipeta de 1 mL
1 Micropipeta de 50 µL.
1 Piseta con agua desionizada o destilada
2 Celdas de plástico de 3 ml
4 Tubos de vidrio de 13X100
Puntas para micropipeta.
Gradilla.

EQUIPO

Fotómetro con filtro de lectura de: 520 nm.
Centrífuga

CONTENIDO DEL EQUIPO

Reactivo 1 Fosfatos pH 7.4, 50 mM
Sol. Tampón 2-4 DCPS, 4 mM

Reactivo 2 Uricasa 60U/L
Vial Enzimas Peroxidasa 660 U/L
Ascorbato-Oxidasa 200 U/L
4 - Aminofenazona 1Mm

Standard Sol. Ác. Úrico 6.0 mg/dL

PREPARACION Y ESTABILIDAD

Disolver, con agitación suave, el contenido del vial de enzimas R.2 con un poco de R.1 tampón, una vez disuelto el liofilizado retornar al frasco original de tampón, homogeneizar la solución. Esta solución es estable 1 mes a 2-8°C o 10 días a temperatura ambiente, protegida de la luz.

5. PROCEDIMIENTO

TECNICA

Longitud de onda: 520 nm (490-550)

Temperatura : 25/30/37°C

Paso de luz : 1 cm paso de luz

Ajuste del cero con blanco de reactivo.

| | Blanco | Estándar | Muestra |
|----------|--------|----------|---------|
| Estándar | | 25 µL | |
| Muestra | | | 25 µL |
| Reactivo | 1.0 mL | 1.0 mL | 1.0 mL |

Mezclar e incubar durante 5 min a 37°C ó 10 min a temperatura ambiente.

Efectuar las lecturas de las densidades ópticas del estándar y de la muestra frente al blanco del reactivo. Coloración estable como mínimo 30 min.

Cálculo

Conc. Muestra mg/dL = D.O. Muestra / D.O. Estándar X Conc. estándar

Estándar= 6.0 mg/dL

mg/dL x 59 485 = μ mol/L

Cuando la muestra sea orina, multiplicar el resultado por 10. Si la concentración de la muestra es superior al límite de linealidad (25mg/dL) diluir ésta a la mitad y el resultado final se multiplicará por 2.

Límite de Seguridad Biológica

| | Mujeres | Hombres |
|--------------------------|-----------------|-----------|
| Suero o plasma | | |
| mg/dL | 2.5 - 6.0 | 3.4 -7.0 |
| mmol/L | 148 - 357 | 202 – 416 |
| Orina de 24 horas | | |
| mg/dL | 250 - 750 | |
| mmol/L | 14,872 - 44,616 | |

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia, considerando edad, sexo, estado nutricional y demás factores.

CONSIDERACIONES IMPORTANTES:

- Si la muestra de orina es turbia, calentarla a 60°C para disolver el ácido úrico.
- El ácido úrico en suero es estable de 3 a 5 días en T° de 2-8°C.
- Los anticoagulantes como la heparina, EDTA, oxalato o fluoruro no afectan los resultados de la prueba.
- Se sugiere procesar junto con las muestras algún suero control valorado con niveles normal y anormal que le permitirá tener un control de la exactitud y precisión de los resultados.
- La hemólisis (hasta 100mg/dL de hemoglobina) y la bilirrubina hasta 20mg/dL, no interfieren en los resultados.
- El estándar es muy ávido a contaminarse, cuidar mucho su manipulación, ya que los agentes reductores tienden a disminuir la respuesta del color, mientras que los oxidantes generan aparición de color, aumentando las lecturas de los blancos.
- Los detergentes son inhibidores enzimáticos, asegúrese de que el material de vidrio este perfectamente lavado y enjuagado con agua desionizada.

CONTROL DE CALIDAD

SPINTROL. Normal y Patológico. Sueros control valorados.

2.2 CREATININA **Método colorimétrico-cinético**

1. INTRODUCCIÓN

La creatinina es un producto final del metabolismo muscular. Se origina a partir de la creatina por pérdida de una molécula de agua. A su vez, la creatina se produce por hidrólisis del fosfato de creatina, por acción de la creatin-fosfo-kinasa (CPK), apareciendo como metabolitos de dicha reacción el fosfato energético y la creatina. El radical fosfato puede aportar energía directamente por dicha reacción o a través de su acoplamiento a una molécula de ADP para formar ATP y posterior hidrólisis por acción de ATPasa.

La eliminación de creatinina en el cuerpo humano tiene lugar casi exclusivamente a través de la filtración glomerular, siendo un importante índice del funcionalismo renal. A diferencia de la urea, la eliminación de creatinina por la orina no viene afectada por la diuresis, al mismo tiempo que para una misma persona es muy constante su eliminación diaria con casi independencia de la dieta alimenticia, siendo la masa muscular el factor condicionante más directo de su excreción total por día. En resumen, podemos decir que la eliminación de creatinina en un intervalo de 24 horas es un valor constante, dependiente principalmente de la masa muscular del individuo, y que por otro lado el cálculo del aclaramiento de la creatinina será un parámetro directo del funcionalismo renal.

2.OBJETIVOS

- ✓ Aplicar el manejo adecuado de la técnica para la determinación de creatinina en una muestra biológica.
- ✓ Establecer los valores de referencia de la creatinina y comparar con el valor de nuestra muestra problema a analizar.
- ✓ Definir cuales son las principales patologías que se presentan si tenemos valores altos o bajos de creatinina en una muestra biológica

3.FUNDAMENTO DEL MÉTODO

La reacción química aplicable para fotometría es la descrita por Jaffe, basada en el color anaranjado que se produce al reaccionar la creatinina con el picrato alcalino. Hay varias sustancias en el suero y orina que actúan como cromógenos inespecíficos, lo que es un problema principalmente para el cálculo del aclaramiento. Por este motivo tiene una gran importancia la adecuación de todas

las variables de la reacción, muy especialmente el pH, con el fin de obtener la máxima sensibilidad para la creatinina y la mínima interferencia de cromógenos. Adaptando la reacción a una medida cinética, se logra una gran especificidad debido a que la creatinina reacciona con el picrato alcalino con más rapidez que los cromógenos (metilguanidina, picramato,), por lo que la medida del incremento de color en un breve período de tiempo inicial de la reacción valorarán principalmente creatinina, con poca influencia de los cromógenos inespecíficos, por esto es recomendable, de ser posible, la determinación cinética.

4. PREPARACIÓN

4.1 MUESTRA CLÍNICA

Suero o plasma heparinizado.

La creatinina en suero y plasma tiene una estabilidad de al menos de 24 horas a 2-8°C.

Orina .Diluir previamente a 1:50 con agua destilada, multiplicar el resultado por 50.

4.2 REACTIVOS Y MATERIAL

Material necesario

1 Micropipeta de 1 mL
1 Micropipeta de 200 µL.
1 Pisseta con agua desionizada o destilada
2 Celdas de plástico de 3 ml
5 Tubos de vidrio de 13X100
Puntas para micropipeta
Gradilla.

EQUIPO

Fotómetro termostable a 37°C con filtro de 490-510 nm.
Centrífuga

CONTENIDO DEL EQUIPO

Reactivo 1 Ac. pícrico 17.5 mmol/L
Reactivo 2 Hidróxido sódico 0.29 mol/L
Estándar Sol. Creatinina 2.0 mg/Dl

PREPARACIÓN Y ESTABILIDAD

Los reactivos están listos para su uso.
Son estables a temperatura ambiente hasta la fecha de caducidad indicada en el envase.

Mezcla reactiva:

Mezclar ambos reactivos a partes iguales según necesidades.
Esta mezcla es estable 10 días a temperatura ambiente.

5. PROCEDIMIENTO

5.1 TÉCNICA

Longitud de onda: 490 nm (490-510)
Temperatura : 25/30/37°C
Paso de luz : 1 cm paso de luz
Ajuste del cero con blanco de reactivo.

| | Blanco | Estándar | Muestra |
|----------|--------|----------|---------|
| Estándar | | 200 µL | |
| Muestra | | | 200 µL |
| Reactivo | 2.0 mL | 2.0 mL | 2.0 mL |

Mezclar e incubar 5 min a 37°C ó 10 min a temperatura ambiente.

Mezclar y poner en marcha el cronómetro.
Anotar la D.Optica a los 30 segundos (E1) y a los 90 segundos (E2).
Lectura a 492 nm (490-510)

6. RESULTADOS

6.1 Cálculos

mg/dL creatinina = Δ . Extinción muestra/ Δ . Extinción estándar x conc. estándar
= conc. muestra

mg/dL x 88.4 = µmol/L

DEPURACION DE CREATININA

Depuración de creatinina

$$CC(\text{ml}/\text{minuto}/1.73 \text{ m}^2) = \frac{U \times V}{P} \times \frac{1}{T} \times \frac{1.73}{AS}$$

U= Concentración de orina en mg/dL

V= Volumen

P= Concentración plasmática en mg/dL

T= Tiempo en minutos

1.73= Factor estandarizado

AS= Superficie corporal en m²

Valor de referencia Mujeres 70 – 130 mL/min Hombres 70 – 140 mL/min

6.2 Linealidad

Hasta valores de 15 mg/dL (1326 μ mol/L)

Para valores superiores se deberá diluir a 1:2 con sol. salina, multiplicando el resultado por 2.

6.3 Límite de Seguridad Biológica

Suero. 0.7 - 1.4 mg/dL (61.8 - 132.6 μ mol/L)

Orina. 15 a 25 mg/Kg/24 h

NOTA: En orina debe multiplicar los valores de referencia por los Kg que pesa el paciente.

DEPURACIÓN

Hombres: 97 - 137 mL/min

Mujeres: 88 - 128 mL/min

OBSERVACIONES

La hemólisis interfiere en el test.

No utilizar sueros lipémicos.

CONTROL DE CALIDAD

SPINTROL. Normal y patológico.

2.3 UREA

MÉTODO CINÉTICO "UREASA-GLDH".

1. INTRODUCCIÓN

Urea y amoníaco

La concentración sanguínea de amoníaco es superior en los infantes que en los adultos, debido a que el desarrollo de la circulación hepática se termina después del nacimiento. La hiperamonemia es una entidad que se presenta con frecuencia debido a defectos congénitos en el ciclo de la urea. El error innato del metabolismo más común es la deficiencia en ornitina transcarbamilasa. La hiperalimentación es una causa mucho más frecuente de hiperamonemia en infantes. Con frecuencia, se diagnostica el síndrome de Reye por un amoníaco sanguíneo elevado en ausencia de otra causa demostrable.

Los pacientes adultos muestran elevadas concentraciones de amoníaco sanguíneo en las etapas terminales de: la cirrosis hepática, la falla hepática y la necrosis del hígado aguda y subaguda. Se presagia el comienzo de la encefalopatía hepática por una elevación en el amoníaco sanguíneo. Se ha demostrado que la medición en líquido cefalorraquídeo (LCR) de la glutamina, correlaciona bien con el desarrollo de la encefalopatía hepática. También se puede utilizar la medición de la glutamina en el LCR, para diferenciar la encefalopatía hepática de la séptica. Sin embargo, no es común la medición de la glutamina en el LCR. La excreción de amoníaco urinario se eleva con la acidosis y se disminuye en la alcalosis, puesto que la formación de sales de amonio es un mecanismo importante para excretar el exceso de iones hidrógeno. Daños en los túbulos renales distales, tal como ocurre en la falla renal, la glomerulonefritis, el hipercorticoidismo y la enfermedad de Addison, conllevan a una excreción de amoníaco disminuida sin presentar cambios en los niveles sanguíneos de amoníaco.

Puesto que la urea se sintetiza en el hígado, en la enfermedad hepática sin daño en la función renal, se presenta nitrógeno ureico sérico bajo, aunque la relación urea a creatinina se puede conservar normal. La elevación en el nitrógeno ureico sérico no implica necesariamente daño renal, puesto que la deshidratación puede llevar a concentraciones de nitrógeno ureico tan altas como 600 mg/L. En los infantes que reciben una fórmula alta en proteínas pueden tener niveles de nitrógeno ureico de 250 a 300 mg/L. Naturalmente, enfermedades como la glomerulonefritis aguda, la nefritis crónica, el riñón poliquístico y la necrosis renal elevan el nitrógeno ureico.

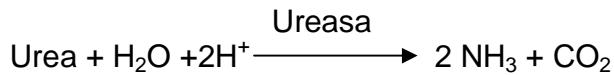
2. OBJETIVOS

- ✓ Aplicar el manejo adecuado de la técnica para la determinación de urea en una muestra biológica
- ✓ Establecer los valores de referencia de la urea y comparar con el valor de nuestra muestra problema a analizar.

- ✓ Definir cuales son las principales patologías que se presentan si tenemos valores altos o bajos de urea en una muestra biológica.

3. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

La ureasa cataliza la hidrólisis de la urea dando amonio y CO₂. El amonio formado se valora mediante una reacción enzimática (GLDH), pasando NADH a NAD⁺. La disminución de la absorbancia frente al tiempo es proporcional a la concentración de urea.



4. PREPARACIÓN

4.1 MUESTRA CLÍNICA

Suero o plasma heparinizado.

4.2 MATERIAL Y REACTIVOS

Material necesario

1 Micropipeta de 1 mL
1 Micropipeta de 200 µL.
1 Piseta con agua desionizada o destilada
2 Celdas de plástico de 3 ml
5 Tubos de vidrio de 13X100
Puntas para micropipeta.
Gradilla.

EQUIPO

Fotómetro termostable a 37°C con filtro de 340 nm.
Centrífuga

CONTENIDO DEL EQUIPO

Reactivo 1 Tampón TRIS pH 7.8, 80 mmol/L

Reactivo 2 Ureasa 3750 U/L

Vial enzimas GLDH 6000 U/L

NADH 0.32 mmol/L

α-cetoglutarato 6 mmol/L

Estándar Sol. Urea 50 mg/dl

PREPARACIÓN Y ESTABILIDAD

Disolver el contenido del vial enzimas R.2 en el frasco de solución tampón R.1

El reactivo al uso es estable un mínimo de 4 semanas a +2+8°C ó 7 días a +15+25°C.

5. PROCEDIMIENTO

5.1 TÉCNICA

Temperatura: 25/30/37°C
Longitud de onda: 340 nm. /334 nm
Paso de luz: 1 cm
Lectura: frente a agua destilada

| | Blanco | Estándar | Muestra |
|----------|--------|----------|---------|
| Estándar | | 10 µL | |
| Muestra | | | 10 µL |
| Reactivo | 1.0 mL | 1.0 mL | 1.0 mL |

Pipetear en un tubo:

Muestra o □ estándar 0.01 mL

Reactivo al uso. 1.00 mL

Mezclar y anotar la disminución de extinción entre los 30 y los 90 segundos
(Δ Extinción)

6.0 RESULTADOS

6.1 Cálculo

Con las diferencias de extinción anotadas, aplicar la siguiente ecuación:

Δ . Extinción muestra/ Δ . Extinción estándar x conc. estándar = conc. muestra

Factor de conversión : mg/dL x 0.1665 = mmol/L

6.2 Linealidad

El método es lineal hasta valores de 500 mg/dL (83.25 mmol/L)

Para concentraciones superiores se deberá diluir la muestra a 1:2 con solución salina, multiplicando el resultado por 2.

6.3 Límite de Seguridad Biológica

Suero: de 15 a 45 mg/dL

Orina: de 20 a 35 g/24 horas

NOTAS:

Muestra: Suero, plasma o orina..

La orina diluirla a 1:50 con agua destilada.

No emplear suero o plasma turbios o hemolizados.

CONTROL DE CALIDAD

SPINTROL. Normal y patológico

Sodio / Potasio / Cloro

1.0 INTRODUCCIÓN

SODIO:

La prueba del sodio sérico es una medida del catión principal (electrolítico, carga positiva) en el espacio vascular, componente del líquido extracelular.

Deberá considerarse una medida proporcional, la proporción entre sodio y agua, más que una medición directa del sodio corporal total. El sistema amortiguador del bicarbonato de sodio es uno de los principales controles renales de las concentraciones de iones hidrógeno, que convierten al sodio en un catión importante para la conservación del equilibrio acidobásico corporal y también para la distribución del agua corporal.

La hipernatremia significa un exceso de sodio en la sangre, esto se advierte cuando hay vómito profuso, succión nasogástrica, enfermedades infecciosas como traqueobronquitis, diarrea acuosa profusa, diabetes insípida, aldosteronismo primario, ingestión inadecuada de agua libre, alimentos con alto contenido de solutos.

La hiponatremia significa una deficiencia sanguínea de sodio o una depleción de sal, que por lo general indica un aumento excesivo de agua respecto a la elevación del sodio; esto sucede en: diarrea o vómito donde se pierde más sodio que agua, drenado de fístulas intestinales, uso prolongado de diuréticos, enfermedad de Addison, insuficiencia renal crónica con acidosis, retención anormal de agua, ingestión excesiva de agua y restitución inadecuada de sal.⁽¹⁸⁾

POTASIO:

El potasio es el catión principal del líquido intracelular. Un desequilibrio en el nivel de potasio tiene un efecto directo sobre la irritabilidad muscular, la función miocárdica y la respiración.

La hiperpotasemia se define como una concentración plasmática mayor de 5.5 mEq/L. Con una función renal adecuada es virtualmente imposible permanecer en un estado de hiperpotasemia pues el potasio es excretado con suma facilidad por el riñón. Por tanto, un incremento significativo de potasio se encuentra principalmente en casos de insuficiencia renal grave con azotemia; también podría haber aumento con una administración desmedida de potasio si hay excreción urinaria inadecuada, con el uso excesivo de diuréticos antagonistas de la aldosterona.

La hipopotasemia se define como una concentración sérica menor de 3.5 mEq/L. Los síndromes de deficiencia de potasio son bastante comunes. Si esta deficiencia es grave, se producen cambios funcionales y estructurales renales en el riñón, los

cuales perpetúan el desequilibrio hidroelectrolítico y acidobásico. Se tiene disminución de potasio en: estados diarreicos, pérdidas abundantes de líquidos gastrointestinales, diuresis masiva, pacientes postoperatorios con pérdidas múltiples de potasio, pacientes después de tratamiento de cetoacidosis diabética, respuesta a la tensión, falta de ingestión adecuada de potasio, síndrome de malabsorción donde el intestino no es capaz de absorber nutrientes.⁽¹⁸⁾

CLORO:

El cloro, el principal anión extracelular, ejerce un efecto directo sobre la presión osmótica, la distribución del agua y el equilibrio entre aniones y cationes. Los niveles bajos de cloro son causados por pielonefritis crónica, crisis del síndrome de Addison, acidosis metabólica y vómito prolongado. Se observan niveles altos de cloro en la deshidratación, insuficiencia cardiaca congestiva, hiperparatiroidismo y el tratamiento prolongado a base de cloro o la ingestión repetida de dicha sustancia.⁽⁶⁾

2.0 OBJETIVOS

- ✓ Determinar la concentración en una muestra biológica de sodio / potasio / cloro utilizando el método de ión selectivo.
- ✓ Destacar la importancia de los iones sodio, potasio y cloro en el metabolismo humano y su relación con diversas patologías.

3.0 FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El método para determinar sodio / potasio / cloro basado en el ion selectivo, utiliza como elemento sensor del ion Cl^- plata/cloruro de plata o sulfuro de plata y la medición de Na^+ / K^+ emplea membranas de intercambio iónico de vidrio para el sodio y membranas de intercambio iónico líquidas que incorporan valiomicina para el potasio.

Hay dos formas generales para medir la potenciometría por electrodo ión selectivo (ISE) en muestras clínicas, la "directa" y la "indirecta". Los sistemas potenciométricos directos miden la actividad del ión en una muestra sin diluir, mientras que los sistemas ISE indirectos miden la actividad del ión en una muestra prediluida.⁽⁶⁾

4.0 PREPARACIÓN

4.1 MUESTRA CLÍNICA:

- ✓ Sangre entera o plasma.
- ✓ La muestra debe recolectarse en ayuno.

- ✓ La muestra debe recolectarse en tubo colector de sangre con heparina de litio.
- ✓ Si se trata de sangre entera la muestra debe mezclarse mediante inversión y rotación del tubo.
- ✓ Para plasma se mezcla mediante inversión y se centrifuga el espécimen dentro de una hora a partir de la recolección.
- ✓ La sangre entera debe analizarse antes de transcurrida una hora a partir de su recolección; después de este período de tiempo, se podría obtener niveles falsamente elevados de potasio. No enfriar ni refrigerar las muestras.
- ✓ El plasma debe analizarse dentro de un periodo de 4 horas a partir de su extracción. Es necesario dejar que las muestras refrigeradas alcancen la temperatura ambiente de la habitación y que sean centrifugadas antes del análisis.⁽¹⁹⁾

Nota:

- ✓ No agitar los tubos
- ✓ Se recomienda utilizar material de plástico de un solo uso para evitar contaminaciones.
- ✓ La muestra es inaceptable si:
 - a) Si el suero se obtiene turbio.
 - b) Si la identificación es inadecuada.
 - c) Si el tubo de recolección no es el adecuado.
 - d) Cuando se haya excedido el tiempo máximo de análisis permisible.⁽⁹⁾

4.2 REACTIVOS:

- ✓ Se utilizan los reactivos para el analizador de ión selectivo. Dependiendo del modelo.⁽¹⁹⁾

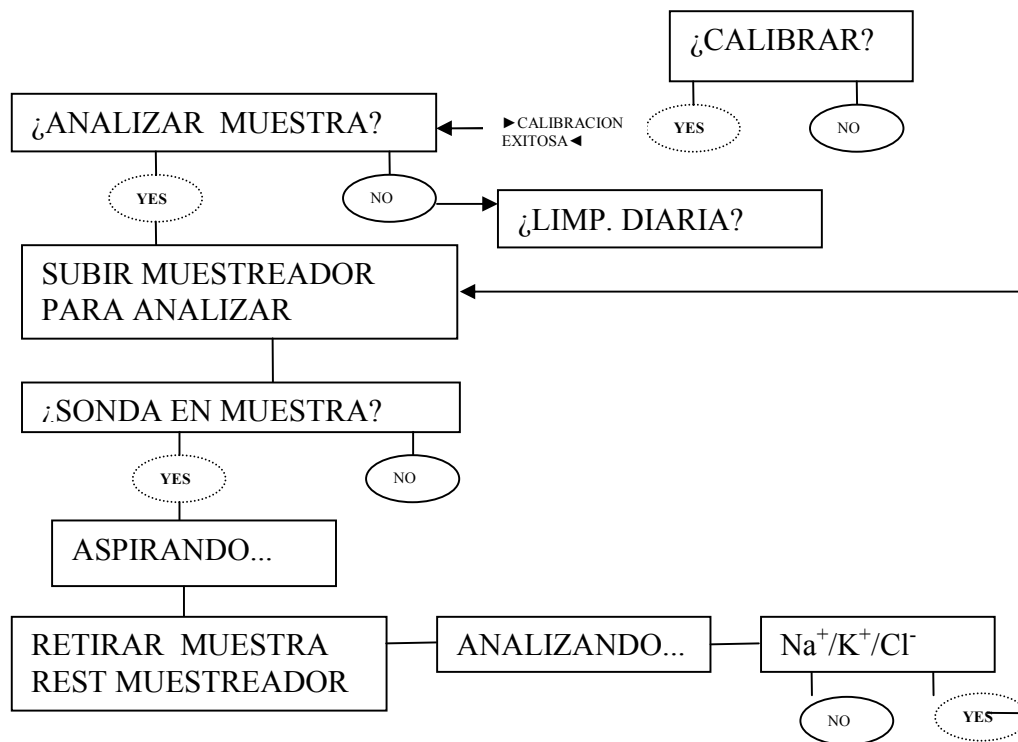
4.3 EQUIPO:

El alumno debe consultar el manual del analizador de ión selectivo para utilizarlo correctamente siguiendo paso a paso las instrucciones de operación.

5.0 PROCEDIMIENTO

5.1 DESARROLLO DE LA PRÁCTICA

1. Encender el analizador.
2. Seguir los pasos que va indicando el analizador primero una calibración a 2 puntos que se efectúa después de instalar o cambiar sensores, módulo de reactivos u otros componentes y posterior el análisis de la muestra como se indica en el siguiente diagrama:⁽¹⁹⁾



Nota:

- ✓ Todos los métodos de análisis de cloruro muestran una interferencia positiva con otros haluros.
- ✓ La única interferencia con haluros clínicamente importante es con el bromuro, el cual se suministra en algunas preparaciones farmacéuticas.
- ✓ Para Sodio / Potasio la interferencia de la muestra puede ser por proteínas o lípidos.⁽¹⁹⁾

5.2 TRATAMIENTO DE RESIDUOS:

Los desechos que se producen en esta práctica se colectan en un colector incluido dentro del analizador.

Los residuos biológico infecciosos como Punzo-cortantes, algodón con sangre, se recolectan y almacenan en los contenedores de deposito temporal (Lab.301) en recipientes rígidos o bolsas de color rojo dependiendo del desecho, con el emblema **RPBI's** y son llevados cada miércoles por el personal auxiliar de intendencia al camión de recolección de **RPBI's**. Los residuos como sangre, plasma, suero, paquete globular, materiales con sangre o sus derivados se tratan internamente en el laboratorio de acuerdo a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002.⁽¹²⁾

6.0 VALORES DE REFERENCIA

- ✓ El intervalo de referencia para el cloruro en suero o plasma es de 98 a 107 mmol/L o mEq/L.
- ✓ Sodio 135 - 145 mmol/L ó mEq/L.
- ✓ Potasio 3.6 - 5.0 mmol/L ó mEq/L.
- ✓ Cloruro 98 mmol/L o mEq/L

Nota:

Estos intervalos fueron obtenidos utilizando métodos indirectos. Cuando se miden por métodos directos estos intervalos serán algo mayores que cuando se miden mediante técnicas indirectas. Los valores de potasio plasmático pueden ser de 0.1 a 0.2 mmol/L ó mEq/L menores que los correspondientes valores séricos.⁽⁶⁾

GASOMETRIA

Pendiente

2.6 EXAMEN GENERAL DE ORINA (EGO)

1.0 INTRODUCCIÓN

Los análisis de orina realizados en el laboratorio clínico, puede proporcionar una información amplia, variada y útil del riñón de un individuo y de las enfermedades sistémicas que pueden afectar este órgano excretor. Por medio de este análisis, es posible elucidar tanto desórdenes estructurales (anatómicos) como desórdenes funcionales (fisiológicos) del riñón y del tracto urinario inferior, sus causas, y su pronóstico. La realización cuidadosa del examen de orina, por parte del laboratorio, ayuda al diagnóstico diferencial de numerosas enfermedades del sistema urinario. Usualmente, los datos de laboratorio obtenidos por medio de este análisis, se logran sin dolor, daño o tensión para el paciente. Esta es la razón por la cual, la realización e interpretación correcta del análisis de orina, por parte del laboratorio permanecerá siempre como una herramienta esencial de la práctica clínica.

En la actualidad, se practican tres tipos de exámenes de orina: análisis de orina por tira húmeda, empleado generalmente por los médicos en sus consultorios y por los pacientes en sus casas; tamizaje de análisis húmedo de la orina, comúnmente llamado análisis básico o rutinario de orina; y citodiagnóstico de la orina, que es una evaluación citológica especializada del sedimento urinario que correlaciona con los análisis realizados por medio de la tira reactiva. El análisis de orina realizado con la tira húmeda es un ensayo de primera etapa para la detección y monitoreo de pacientes con anormalidades químicas. Los pacientes diabéticos a menudo monitorean permanentemente su propia enfermedad, buscando signos de glucosuria, proteinuria, e infecciones del tracto urinario, mediante pruebas realizadas en casa.⁽²⁰⁾

El análisis de orina húmedo o rutinario, proporciona, a costos razonables, un tamizaje adecuado para la detección de anormalidades químicas y morfológicas presentes en la orina. Este procedimiento se compone de dos partes: 1) un análisis macroscópico, en el cual se determinan las características fisicoquímicas (aparición, gravedad específica y la medición de los constituyentes químicos por medio de la tira), y 2) un examen microscópico del sedimento, en campo claro o contraste de fases, para verificar hematuria, piuria, cilindruria, cristaluria, y otros signos. Por medio de este simple examen de orina, un uromicroscopista experimentado puede detectar y monitorear muchas entidades que afectan al riñón y al tracto urinario inferior.

Recientemente, el citodiagnóstico de la orina ha ganado aceptación médica como un análisis nuevo, más sensible en el diagnóstico de ciertas patologías renales y del tracto urinario inferior. Como este análisis requiere mayor inversión de tiempo debido a la preparación de coloraciones, debe reservarse para pacientes sintomáticos con enfermedades renales, del tracto urinario inferior, o neoplasias.⁽⁶⁾

2.0 OBJETIVOS

- ✓ Establecer el método adecuado de recolección de especímenes de orina para un análisis específico.
- ✓ Discutir las propiedades físicas más importantes de la orina y sus relaciones con la enfermedad.
- ✓ Identificar los constituyentes químicos más importantes de la orina, como cuantificarlos y como confirmar su presencia.
- ✓ Describir métodos adecuados para estandarización de los especímenes de orina y de los hallazgos microscópicos más comunes.

3.0 FUNDAMENTO

El análisis de orina rutinario, se basa en un procedimiento que se compone de dos partes: 1) un análisis macroscópico, en el cual se determinan las características fisicoquímicas (apariencia, gravedad específica y la medición de los constituyentes químicos por medio de la tira como proteínas, glucosa, cetonas, pH), y 2) un examen microscópico del sedimento, en campo claro o contraste de fases, para verificar hematuria, piuria, cilindruria, cristaluria, y otros signos. (20)

4.0 PREPARACIÓN

4.1 MUESTRA CLÍNICA

El cuidado en la recolección de la orina y su entrega rápida en el laboratorio, son cruciales para obtener una información óptima. La orina debe ser colectada en un recipiente limpio, estéril, que tenga un cierre seguro para prevenir posibles derramamientos, evaporación o contaminación.

Estos recipientes deben rotularse con el nombre del paciente, fecha y hora de recolección.

Para que los datos del uroanálisis sean precisos, es esencial que la orina sea examinada dentro de las dos horas siguientes a su recolección o preservada de alguna manera, usualmente por refrigeración (2° a 8 °C). Se pueden usar fijadores o preservativos adecuados, siempre y cuando se entiendan claramente sus efectos sobre la orina y sobre los ensayos en ella realizados. Si la orina es recolectada sin preservativos y permanece a temperatura ambiente se empezará a descomponer. Los preservativos actúan impidiendo los cambios químicos asociados a la descomposición y previniendo el crecimiento y metabolismo de los microorganismos. El tolueno, fenol, timol y preservativos ácidos son usados frecuentemente para los análisis químicos de la orina. Otras formas de preservación incluyen el ajuste del pH y la protección de la luz. Para preservar las

estructuras celulares puede emplearse etanol (95%), hay también disponibles fijadores comerciales como Mucolox . Los laboratorios son responsables de la selección adecuada del tipo y cantidades de preservativo de la de orina necesarios para preservar las estructuras celulares.(6)

Para cuantificar diversos aspectos de la función renal, frecuentemente se emplean análisis de orina recolectada durante un determinado período de tiempo. La orina debe reflejar la excreción en un intervalo de tiempo medido con precisión. Estos especímenes no deben incluir la orina que se encuentra en la vejiga antes de la iniciación de la recolección. En la toma de muestras de orina de 24 horas, se debe desechar la orina de la primera micción de la mañana del día en el cual se inicia la recolección y recolectar toda la orina producida durante 24 horas, incluyendo la primera orina de la mañana del segundo día.

La primera orina de la mañana es usualmente la mejor para el análisis porque es la orina más concentrada.

Las muestras deben estar libres de secreciones vaginales u otra clase de partículas extrañas.

Este procedimiento puede modificarse si no es necesario el examen bacteriológico de la muestra. La recolección del chorro medio sin el lavado previo y sin usar un envase estéril, proporciona una muestra satisfactoria para el examen de rutina. (20)

4.2 REACTIVO

Reactivo (Tinción de Sternheimer-Malbin) comercial

TINCIÓN DE STERNHEIMER MALBIN

Para sedimento urinario. Facilita la identificación de las células.

Método

Se vuelve a suspender el sedimento en el tubo de centrifuga y se añade una gota del colorante; se espera tres minutos. Luego se pone una gota sobre un portaobjetos, se cubre y se examina al microscopio.

Resultados

| | |
|---------------------|---|
| Hematías: | Color rosado |
| Leucocitos: | Púrpura oscuro con núcleo rojo oscuro. |
| Granulaciones: | Citoplasmáticas violetas. |
| Células brillantes: | Son leucocitos neutrófilos incoloros o de color azul claro. Son característicos de polinefritis. |
| Células renales: | Núcleo púrpura oscuro, con un estrecho citoplasma de color púrpura-anaranjado. |
| Células vesicales: | Núcleo azul oscuro y citoplasma azul claro. |
| Células epiteliales | |

| | |
|---------------------------------|--|
| de descamación: | Núcleo púrpura, citoplasma rosado o violeta. |
| Cilindros hialinos: | Rosado o púrpura claro. |
| Cilindros finamente granulosos: | Cilindros rosados, con granulaciones de color púrpura. |
| Cilindros grasos: | Color rosado, gotas de grasa incoloras. |
| Cilindros hemáticos: | Cilindro rosado, hematíes incoloros o lila claro. |
| Cilindros céreos: | Púrpura claro u oscuro. |

4.3 EQUIPO

- ✓ Microscopio óptico.
 - ✓ Centrifuga clínica.
- EQUIPO DE UROANALISIS SPIN LAB

Nota:

El alumno debe consultar el manual del microscopio óptico y centrifuga para saber cuales son las instrucciones de operación, datos y características de funcionamiento de los instrumentos.

4.4 MATERIAL

- ✓ Envases desechables para orina.
- ✓ 1 probeta graduada de 50 ml.
- ✓ 4 tubos para centrifuga de 13 x 100mm.
- ✓ 2 tubos de ensayo de 13 x 100mm.
- ✓ 4 portaobjetos.
- ✓ 4 cubreobjetos.
- ✓ 2 pipetas serológicas graduadas de 10 ml.
- ✓ 2 pipetas Pasteur.
- ✓ 2 bulbos de goma.
- ✓ Tiras reactivas comerciales.
- ✓ Colorante de Sternheimer-Malbin.

5.0 PROCEDIMIENTO

EXAMEN FÍSICO DE LA ORINA

Volumen.

El volumen urinario está influenciado por la ingesta de líquidos; por los solutos excretados, principalmente, sodio y urea; por la pérdida de fluidos en la transpiración y la respiración; y por el estado de los sistemas cardiovascular y renal. Normalmente un adulto excreta de 750 a 2000 mL en 24 horas. Aunque el

volumen de orina de un espécimen recolectado al azar no tiene importancia clínica, el volumen del espécimen recibido debe ser anotado para efectos de documentación y estandarización.⁽⁶⁾

Olor.

Una orina normal fresca no tiene mal olor. Un olor desagradable, puede indicar que el espécimen es demasiado viejo para obtener un análisis preciso. Un olor fétido en un espécimen recolectado desde hace más de dos horas (y no preservado o refrigerado) indica que el espécimen es inadecuado. El olor puede también dar señales de ciertas anomalías de la orina. Un olor parecido al amoníaco, es sugestivo de presencia de bacterias degradadoras de la urea, un olor a frutas indica la presencia de acetona (cetona), un olor dulce es sugestivo de la presencia de glucosa u otros azúcares, un olor fétido es sugestivo de pus o inflamación. El olor es importante en la detección clínica de la enfermedad llamada orina de miel de maple (un defecto metabólico congénito).⁽⁶⁾

Apariencia (color y turbidez).

El color de la orina está determinado, en gran medida, por su grado de concentración. Las orinas normales varían ampliamente de colores, desde incoloras hasta amarillo oscuro. La interpretación del color es subjetiva y varía según el laboratorio que la examine. Para que el analista describa adecuadamente el color de la orina, puede emplear como puntos de referencia una escala estandarizada de colores, evitando el uso de términos ambiguos como pajizo o sangriento.

La orina roja es, tal vez, la coloración de mayor importancia clínica. Este color puede ser producido por hemoglobina urinaria o mioglobina, eritrocitos intactos, eritrocitos hemolisados, o hemoglobina libre (hemólisis). En la glomerulonefritis aguda el color característico de la orina es pardo rojizo. Normalmente una orina fresca es clara. Cuando la orina se deja reposar, se precipitan cristales amorfos, generalmente uratos, produciendo turbidez. La turbidez de la orina debe ser registrada y explicada mediante la evaluación microscópica.⁽⁶⁾

Gravedad específica.

La gravedad específica de la orina es una medida parcial de la capacidad del riñón para concentrar orina. Su rango normal es de 1.003 a 1.035 g/mL. Los valores iguales o superiores a 1.020 indican una buena función renal y la excreción de una cantidad aumentada de solutos disueltos excretados por los riñones. Valores de densidad específica iguales o superiores a 1.035 indican la presencia de solutos extraños, lo cual debe ser investigado. Una disminución de la gravedad específica se observa en pacientes quienes usan diuréticos.

Las sustancias de alto peso molecular afectan la gravedad específica en un grado mayor que la producida por simples cristaloides. Esto es importante cuando la orina contiene moléculas grandes como glucosa, proteínas o medios de contraste radiográficos. Cuando se presentan niveles elevados de glucosuria o proteinuria, es necesario aplicar factores de corrección para ajustar la gravedad específica a un valor más representativo; se debe restar 0.004 por cada 10 g/l de

glucosa y 0.003 por cada 10 g/l de proteína. Valores de 1.040 o superiores están asociados con la presencia de medios de contraste radiográficos o preservativos.

La gravedad específica se puede medir empleando un hidrómetro y un recipiente apropiado. El uso de los hidrómetros tiene varias limitaciones: 1) requieren un volumen grande de orina (10 a 15 mL); 2) están calibrados para ser usados a 20 °C, si la orina no está a esta temperatura de referencia se deben aplicar factores de corrección; 3) los hidrómetros no pueden ser recalibrados. Por estas razones, los laboratorios ya no emplean estos elementos.

La mayoría de los laboratorios poseen refractómetros que relacionan la densidad de una solución con la gravedad específica. El uso de estos refractómetros tiene algunas ventajas: 1) requieren solo una o dos gotas de orina; 2) tienen la temperatura compensada; 3) las lecturas están menos afectadas por la densidad que las de los urinómetros; y 4) poseen un tornillo para calibrar a cero. Su gran desventaja es el costo.

Método de la tira reactiva.

Las tiras reactivas disponen de un método colorimétrico indirecto para medir la gravedad específica. Este método usa una tira que contiene un electrolito pretratado que muestra un cambio de pH de acuerdo a la concentración iónica de la orina. Este ensayo es rápido, sencillo y no requiere equipos adicionales.⁽⁶⁾

Osmolalidad.

El riñón normal es capaz de producir orina con un rango de 50 a 1200 mOs/Kg. Los rangos de la osmolalidad en orina oscilan desde 1/6 a cuatro veces la osmolalidad del suero normal (280-290 mOs/Kg). La osmolalidad es medida por un osmómetro.

La osmolaridad está determinada por el número de partículas por unidad de masa, mientras la gravedad específica es un reflejo de la densidad (tamaño o peso) de las partículas en suspensión

Generalmente la gravedad específica y la osmolaridad son directamente proporcionales de un modo lineal, aunque hay excepciones importantes. Por ejemplo, si a un paciente se le administran medios de contraste yodados por pielografía intravenosa, la gravedad específica puede elevarse hasta 1.070 o 1.080, mientras que la osmolalidad permanecerá dentro de los límites normales. Las partículas de contraste tienen una masa lo suficientemente grande para elevar la gravedad específica, pero hay muy pocas moléculas presentes que puedan producir un notable incremento en la osmolalidad.⁽⁶⁾

EXAMEN QUÍMICO DE LA ORINA

Análisis por tira reactiva.

Los análisis por tira reactiva han permitido a los laboratorios de uroanálisis producir resultados químicos semicuantitativos de una manera rápida, exacta y eficiente. En general, los análisis de orina adecuadamente realizados por medio de tiras reactivas, son sensibles, específicos y económicos.

Los análisis realizados por medio de tiras reactivas deben efectuarse en orinas bien mezcladas y equilibradas a la temperatura ambiente. Cada parámetro

químico debe ser evaluado en un intervalo de tiempo específico, de acuerdo a lo indicado en las instrucciones del fabricante. Deben tomarse del envase, solamente el número de tiras requerido para los análisis inmediatos y el envase debe taparse nuevamente asegurando que la tapa quede bien ajustada. Las tiras reactivas deben ser almacenadas en un lugar fresco (no refrigeradas). El medio ambiente debe estar libre de humedad. Nunca se deben usar tiras para orina caducadas o expuestas al aire.

Después de sumergir la tira reactiva en la orina, se debe remover el exceso de orina golpeando la tira suavemente en el borde del recipiente que contiene el espécimen. Se debe comparar individualmente la reacción de cada zona reactiva con su correspondiente en la carta de colores, bajo una iluminación adecuada. Los resultados positivos de las tiras reactivas pueden requerir confirmaciones por métodos químicos y microscópicos. La información proporcionada por los fabricantes debe ser revisada para identificar fuentes de inhibidores y resultados falsos positivos y negativos.⁽²⁰⁾

pH Urinario.

Aunque el método estándar para la medición del pH emplea electrodos de vidrio, el pH urinario, usualmente, es medido con indicador de papel, debido al hecho de que pequeños cambios en el pH son de poca importancia clínica. La mayoría de los laboratorios de uroanálisis emplean tiras reactivas multitest con dos indicadores, rojo de metilo y azul de bromotimol. Estos indicadores proporcionan un rango de pH de 5.0 a 9.0, el cual se manifiesta por un cambio de color de naranja(ácido) a verde y azul (alcalino). El rango de pH urinario es 4.7 a 7.8. Las muestras de orina extremadamente ácidas o alcalinas, usualmente indican especímenes mal recolectados.

El pH es importante para el manejo clínico de las piedras o cristales.⁽²⁰⁾

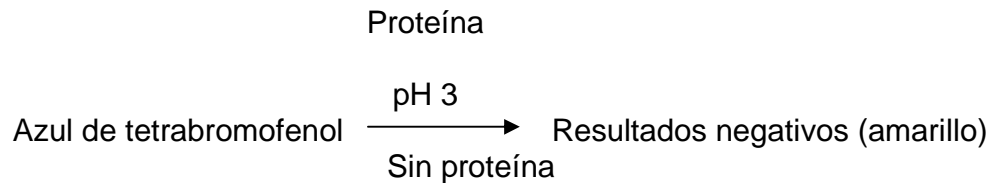
Proteínas.

Las personas sanas pueden tener una excreción diaria de proteínas de 100 mg/día, una fracción muy pequeña del contenido de proteínas plasmáticas. La mayoría de la proteína en la orina es albúmina que pasa la membrana glomerular, pero también pueden estar presentes proteínas de peso molecular pequeño como las globulinas. Una vez filtradas las proteínas son casi completamente reabsorbidas en el túbulo proximal. La proteinuria, por lo tanto, puede ser el resultado tanto de un incremento en la filtración como de una disminución en la reabsorción (función tubular).

Las tiras reactivas son un procedimiento de tamizaje para la proteinuria. Como la especificidad de las tiras reactivas está limitada a la detección de albúmina, es altamente recomendable que el laboratorio procese simultáneamente una prueba por tira reactiva y una prueba de precipitación por ácido para la detección de todos los tipos de proteínas. Las tiras reactivas son sensibles al pH y dependen de la presencia de proteínas para la generación de color. La presencia de la proteína en la tira cambia el pH del medio de contraste impregnado en la zona reactiva, produciéndose el cambio de color

pH 3

Azul de tetrabromofenol \longrightarrow Resultados positivos (azul verdoso)

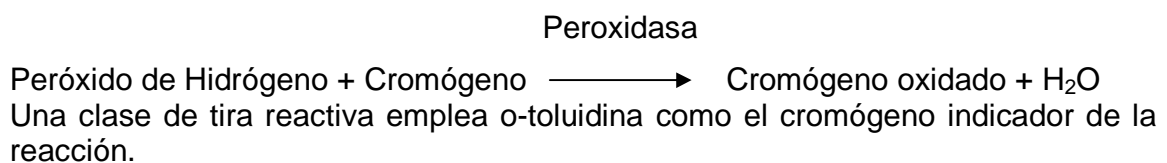
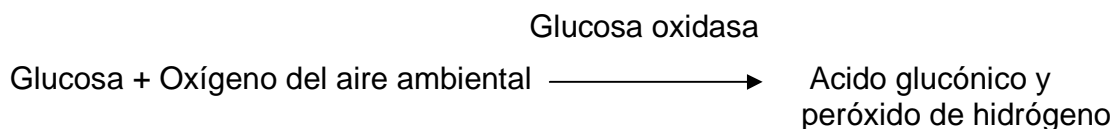


Un resultado positivo o débilmente positivo debe ser confirmado por otros métodos más específicos como el ácido tricloroacético o el ácido sulfosalicílico. Un resultado débilmente positivo y uno fuertemente positivo pueden indicar la presencia de fármacos o proteínas de Bence Jones.⁽⁶⁾

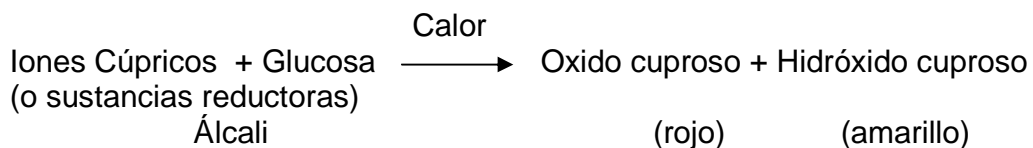
Azúcares.

1. Ensayos enzimáticos.

El ensayo de la tira reactiva es un excelente análisis específico para glucosa. Detecta la oxidación de la glucosa a ácido glucónico:



2. Reducción del Cobre

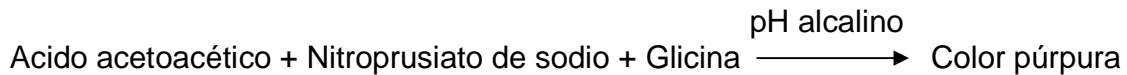


La tableta Clinitest (Ames Division) brinda la posibilidad de detectar otros azúcares. Este es un ensayo basado en la reducción del cobre que mide el total de sustancias reductoras presentes en la orina. Además de glucosa, el Clinitest puede detectar azúcares como galactosa, lactosa y pentosa.⁽⁶⁾

Cetonas.

El término cuerpos cetónicos incluye tres componentes químicos diferentes pero muy relacionados: ácido acetoacético, ácido beta hidroxibutírico y acetona. Los ensayos realizados por medio de tiras reactivas emplean la reacción de

nitroprusiato de sodio que detecta acetona y ácido acetoacético pero no beta hidroxibutírico, el cuerpo cetónico primario. Es importante saber que el reactivo de nitroprusiato de sodio reacciona principalmente con el ácido acetoacético; la acetona tiene solo un 20% de reactividad comparada con el ácido acetoacético:

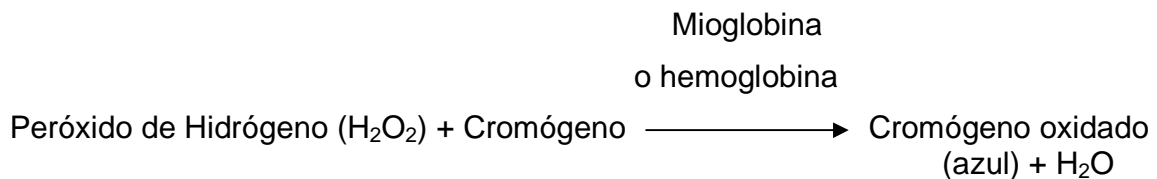


La determinación de cetonas es importante en el monitoreo de la diabetes y de la cetoacidosis y debe realizarse siempre que se determinen azúcares.⁽⁶⁾

Sangre y mioglobina.

Una orina roja indica usualmente la presencia de eritrocitos, hemoglobina o mioglobina. La hematuria, a menudo, representa una combinación de eritrocitos intactos (más de 5 por campo de alto poder), eritrocitos fragmentados y hemoglobina libre. La hematuria gruesa o macroscópica implica hemorragia o sangrado fresco, lo que en un medio de orina ácida, da como resultado una apariencia de roja a parda, turbia, o ahumada.

El método empleado por la tira reactiva para determinar hemoglobina o mioglobina se fundamenta en una actividad semejante a la de las peroxidasas:



Un ensayo positivo indica la presencia de hematuria, hemoglobinuria o mioglobinuria, siendo necesario un análisis microscópico para confirmar la presencia de eritrocitos. La presencia en la orina de agentes oxidantes como los yoduros y bromuros, puede causar resultados falsos positivos; grandes cantidades de ácido ascórbico (usado en algunos antibióticos) pueden producir resultados falsos positivos en algunas tiras reactivas.

La mioglobina es una porfirina ferrosa similar a la hemoglobina; se encuentra, comúnmente, en la orina en pacientes con traumas severos que involucran destrucción muscular. Cuando la mioglobina es liberada a la circulación, es rápidamente excretada por el riñón. Al igual que la hemoglobina, su presencia producirá orinas de apariencia rosada a roja.⁽⁶⁾

Bilirrubina.

Orinas espumosas, de color amarillo a pardo, u oscuras son sugestivas de la presencia de bilirrubina conjugada. La orina normal no contiene bilirrubina. Los pacientes ictericos con enfermedad hepatocelular como hepatitis o enfermedad obstructiva como cirrosis biliar pueden tener bilirrubina conjugada en la orina.

El método empleado por las tiras reactivas para determinar bilirrubina se basa en la reacción de diazoción.



Los resultados negativos de orinas sospechosas y los resultados positivos cuestionables provenientes de orinas coloreadas, deben ser confirmados empleando tabletas de Ictotest (Ames Division, Miles Laboratories). El Ictotest emplea la misma reacción de diazoación que las tiras reactivas. Se pueden encontrar resultados falsos negativos, en orinas no frescas porque la bilirrubina urinaria puede hidrolizarse u oxidarse por acción de la luz.⁽⁶⁾

Urobilinógeno.

El urobilinógeno es un compuesto coloreado, resultado de la reducción de la bilirrubina por acción de las bacterias en el intestino. Las orinas normales contienen pequeñas cantidades de urobilinógeno. El urobilinógeno se encuentra disminuido en niños deficientes en bacterias intestinales; en pacientes después de la administración de antibióticos que reducen la flora intestinal, y en pacientes con enfermedades obstructivas hepáticas. Se encuentra un aumento del urobilinógeno en pacientes con anemias hemolíticas (aumento de formación de bilirrubina) y disfunción hepática.

El método empleado por las tiras reactivas para la determinación del urobilinógeno varía según el fabricante. Algunos emplean la reacción de Erlich, usando p-dimetilaminobenzaldehído en una reacción simple de color con el profobilinógeno. Esta reacción no es específica para urobilinógeno, pudiéndose encontrar resultados falsos positivos con otros compuestos que también reaccionan con el reactivo de Ehrlich. Otros emplean una reacción específica para el urobilinógeno: el urobilinógeno reacciona con un compuesto de diazonio produciéndose un color rojo.

Para la determinación del urobilinógeno es necesario un espécimen fresco porque el compuesto es sensible a la luz. El espécimen preferido para la determinación cuantitativa del urobilinógeno urinario es una orina recolectada durante las dos primeras horas de la tarde. Este tiempo de recolección se debe a los patrones de excreción diurna del urobilinógeno.⁽⁶⁾

Nitritos.

El ensayo de nitritos es empleado en los laboratorios de uroanálisis para detectar bacteriuria. El método empleado en las tiras reactivas para determinar nitritos se basa en la reducción de nitratos a nitritos por la acción enzimática de ciertas bacterias presentes en la orina. En un pH ácido los nitritos reaccionan con el ácido p-arsanílico formando un compuesto de diazonio, el cual a su vez reacciona con N-(1-naftil)etiléndiamina produciendo un color rojo. El ensayo de nitritos debe ser realizado en especímenes recolectados en la primera orina de la mañana o en una muestra de orina que haya sido recolectada después de 4 horas o más, a partir de la última evacuación de la vejiga, con el fin de permitir que durante este tiempo los microorganismos metabolicen el nitrato dentro de la vejiga. En orinas pasadas o viejas, el ensayo de nitritos puede ser positivo como resultado de la contaminación con bacterias después de la micción. La prueba de nitritos es específica para organismos gram negativos, sin embargo, se pueden

obtener resultados falsos negativos si están presentes microorganismos como enterococos, estreptococos o estafilococos.⁽⁶⁾

Esterasa leucocitaria.

La presencia de leucocitos (piuria) es un indicador de inflamación clínicamente importante. El método empleado para la determinación de leucocitos intactos y lisados en las tiras de orina está basado en la presencia de esterases intracelulares. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de los ésteres, liberando componentes que son luego empleados en una reacción de color. La intensidad de la reacción de color es directamente proporcional a la cantidad de leucocitos presentes en el espécimen. La presencia de tricomonas y agentes oxidantes pueden producir falsos positivos.⁽⁶⁾

Melanina.

Las orinas normales no contienen melanina. La melanina se encuentra en orinas de pacientes con melanoma maligno. Los pacientes con esta neoplasia maligna excretan precursores incoloros de melanina (melanógenos), los cuales al ser expuestos al aire se polimerizan formando un pigmento oscuro de melanina. Los análisis para tamizaje emplean cloruro férrico que oxida los melanógenos a melanina, la cual vuelve la orina a un color pardo oscuro.⁽⁶⁾

EXAMEN MICROSCÓPICO DE ORINA

Una identificación microscópica precisa del sedimento urinario es importante para el reconocimiento temprano de infecciones, procesos inflamatorios, y neoplasias que pueden afectar el tracto urinario. Está en debate si todos los especímenes de orina se deben someterse rutinariamente al análisis microscópico, el cual exige mayor inversión de tiempo. En su lugar, la mayoría de los trabajadores del laboratorio, están de acuerdo en que el examen microscópico de orina solo debe practicarse a pacientes sintomáticos, cuando el médico lo requiera específicamente y cuando se encuentre un análisis macroscópico anormal, es decir, cuando se encuentre hematuria, proteinuria o piuria (resultado de nitratos o esterasa positivos).⁽²¹⁾

Microscopía de campo claro de una orina no teñida.

La microscopía de campo claro no coloreada emplea luz reducida para delinear los elementos más translúcidos de la orina, como, cilindros hialinos, cristales y filamentos de moco.

La identificación precisa de leucocitos, macrófagos, células del epitelio tubular renal, y células que contienen inclusiones virales puede ser muy difícil en preparaciones no coloreadas. Para confirmar los resultados deben emplearse técnicas citológicas y preparaciones teñidas.

Procedimiento

La orina debe examinarse mientras esté fresca, algunas células y cilindros pueden desintegrarse en un lapso de una a tres horas. La refrigeración de 2° a 8° C por 48 horas, usualmente previene la desintegración de las células y entidades patológicas. Con propósitos de estandarización, cada espécimen de orina debe concentrarse de diez a veinte veces. El examen se realiza de la siguiente manera:

1. Mezcle bien el espécimen.
2. Ponga un volumen fijo (10, 12, ó 15 mL) de orina en un tubo de centrifuga graduado.
3. Centrifugue a 1500 rpm o aproximadamente 80 G por 5 minutos.
4. Extraiga el sobrenadante por decantación cuidadosa o aspiración hasta un volumen fijo: 1ml y 0.4 mL, son los más comunes. Resuspenda el sedimento golpeando suavemente en el fondo del tubo.
5. Ponga una gota el sedimento resuspendido en un área de una lámina estandarizada.
6. Examine con bajo poder (100x) y luz atenuada. Ajuste el enfoque fino permanentemente mientras se explora al azar el área cubierta. Durante la revisión evalúe el espécimen en busca de células epiteliales transicionales y escamosas, cristales, moco, bacterias, levaduras y artefactos. Elabore el reporte de acuerdo a los protocolos del laboratorio. La identificación posterior de cilindros, células epiteliales renales, eritrocitos y leucocitos debe ser refinada empleando el objetivo de alto poder.
7. Examine, al menos, diez campos empleando luz tenue. Asegúrese de examinar los bordes porque a menudo los cilindros se encuentran a lo largo de los bordes del cubre objeto. Los cristales anormales, cuando están presentes, deben contarse con el objetivo de bajo poder. Una bacteriuria visible en bajo poder debe ser reportada, por lo menos, con 2+.
8. Examine, al menos, diez campos con alto poder (440x) y reporte con valores numéricos eritrocitos, leucocitos, y células del epitelio tubular renal.
9. Reporte todos los conteos (promedio de 10 campos) y evalúe cualitativamente de acuerdo a la terminología estandarizada.⁽²¹⁾

Microscopía de campo claro con tinciones supravitales.

El detalle celular se realiza en sedimentos teñidos. Es frecuente el uso de un colorante de cristal violeta-safranina O para la evaluación rápida de ciertos elementos celulares.

Procedimiento

1. Añadir una o dos gotas de colorante violeta-safranina O a, aproximadamente, 1 mL de sedimento de orina precentrifugado y concentrado a ese volumen.

2. Mezclar con una pipeta y poner una gota de esta suspensión en una laminilla.

Muchos laboratorios de uroanálisis recomiendan el uso de la microscopía de contraste de fases para una mejor detección de los elementos formados más translúcidos del sedimento urinario. Los cilindros hialinos, moco, y bacterias pueden escapar a la detección empleando la microscopía convencional, no teñida, bajo campo claro. La microscopía de contraste de fases tiene la ventaja de endurecer los contornos inclusive de los elementos más efímeros, haciendo más sencilla su detección. Siempre se logra un detalle morfológico mejor de los elementos formados (notablemente en cilindros y células) con el uso de un microscopio de contraste de interferencias.⁽²¹⁾

Cristales.

Los cristales urinarios son vistos comúnmente. Usualmente los cristales no están presentes en orinas frescas recién obtenidas y en general, la formación de los cristales es considerada como un artefacto del sistema de recolección. Los cristales se forman cuando varios constituyentes químicos llegan a saturarse o sufren un cambio en su solubilidad, cuando la orina es almacenada a temperaturas más bajas. Ciertas sustancias químicas, como la albúmina, previenen la cristalización. Cuando la orina se calienta a 37 °C, la mayoría de los cristales desaparecen. Aquellos cristales que todavía permanecen, tienen importancia diagnóstica, cuando se correlacionan con síntomas clínicos.

Los tipos de cristales urinarios dependen del pH de la orina fresca. La cistina, ácido úrico, leucina, y tirosina son los cristales de mayor importancia diagnóstica y por tanto deben ser identificados. Debido a la limitada relevancia clínica de los cristales, algunos laboratoristas están de acuerdo en que no debe desperdiciarse tiempo en su identificación específica. La formación de muchos cristales está inducida por varios medicamentos y su importancia clínica no es clara aún.⁽²¹⁾

Organismos.

En un espécimen de orina bien recolectado y procesado, la presencia de organismos es importante desde el punto de vista clínico. Se reportan, frecuentemente, bacterias, hongos, parásitos, y células infectadas con virus. Los organismos vistos en un espécimen de orina son microscópicamente reconocibles como estructuras intra o extracelulares. Con la microscopía de campo claro se detectan fácilmente bacterias, hongos y parásitos.

La detección de bacterias intracelulares fagocitadas y hongos, organismos de Toxoplasma, y cuerpos de inclusión viral, usualmente requieren procedimientos citológicos.

La identificación exacta de los organismos ayuda en el diagnóstico clínico diferencial de infecciones del sistema urinario. Las preparaciones coloreadas son importantes en la evaluación de organismos, identificación de células inflamatorias

asociadas, en la valoración de la exfoliación epitelial, y en la formación de cilindros renales con el fin de identificar su localización. Se deben emplear técnicas microbiológicas para confirmar y clasificar completamente algunos organismos urinarios.⁽²¹⁾

Bacterias.

La orina de individuos normales es estéril y no contiene bacterias. Algunas bacterias pueden estar presentes por contaminación durante la recolección o por almacenamiento prolongado. Se puede determinar una concentración de menos de 10³ bacterias/mL, cuando se han visto bacterias en un espécimen de orina centrifugado pero no en el espécimen sin centrifugar. La presencia de bacterias en un espécimen sin centrifugar indica que hay una concentración mayor de 10³ bacterias/mL. La presencia de 10⁵ bacterias/ml o más sugiere una infección de tracto urinario. Este número corresponde a 10 o más bacterias por campo de alto poder. La identificación de bacterias, cocos o bacilos puede hacerse por microscopía de campo claro o por contraste de fases. Ocasionalmente hay dificultad en diferenciar bacterias de cristales amorfos.⁽²¹⁾

Hongos.

Las infecciones del tracto urinario (ITU) producidas por hongos son comunes en pacientes diabéticos, en aquellos que toman medicamentos desde el nacimiento, o en aquellos que han recibido terapia intensiva con antibióticos o terapia inmunosupresora. En la mayoría de las ITUs de pacientes no inmunocomprometidos, se ha observado un patrón inflamatorio asociado.

Candida albicans es el hongo más común, identificándose como levadura o micelio. En general, la apariencia de gemación de levadura indica que el hongo ha coexistido con el huésped, mientras que la forma micelar aparece durante la invasión al tejido. Las levaduras de *Candida albicans* son altamente retractiles y miden de 3 a 5 µm. Suelen ser confundidas con eritrocitos. A diferencia de los eritrocitos, las levaduras no son lisadas por ácidos.⁽²¹⁾

Parásitos.

La presencia de parásitos en la orina indica contaminación fecal o vaginal. La *Trichomona vaginalis*, un flagelado, es el parásito que más comúnmente se observa en la orina. La incidencia de este tipo de parásito en mujeres es muy alta pudiendo producir vaginitis severa. En el hombre, el parásito causa una uretritis asintomática. Debido a la motilidad de este organismo oval, la microscopía de campo claro es empleada como la forma más sencilla y rápida de identificación. Los tricomonidos inmóviles pueden ser confundidos con leucocitos o células epiteliales.

Se han encontrado huevos de helmintos (*Enterovius vermicularis*) en la orina de niños por contaminación fecal. Morfológicamente un huevo de helminto está rodeado por una cápsula con dos capas, transparente y delgada, pudiéndose ver, enrollado dentro de ella, un embrión. En la orina, también pueden encontrarse huevos de trematodos.⁽²¹⁾

Células infectadas de virus.

Con una frecuencia cada vez mayor, se encuentran cambios celulares inducidos por virus en el sedimento de orina de pacientes inmunocomprometidos. Se deben emplear técnicas citológicas para asegurar la identificación de citomegalovirus, herpes simplex y Polyomavirus, los cuales producen células con inclusiones intranucleares diagnósticas, siendo estas las infecciones virales más comunes del sistema urinario. Las células de inclusión viral deben distinguirse de las células de inclusión provenientes de fuentes no virales, como la exposición a metales pesados (plomo y cadmio) y de cambios celulares degenerativos no específicos.⁽²¹⁾

Eritrocitos.

Una orina normal, examinada con objetivo de alto aumento, no debe contener más de unos cuantos eritrocitos. Estas células aparecen en la orina después de lesiones vasculares o trastornos del riñón o del tracto urinario inferior. La presencia de eritrocitos acompañada de cilindros hemáticos o eritrocitos dismórficos es sugestiva de sangrado del parénquima renal o del glomérulo. La detección urinaria de eritrocitos dismórficos, especialmente acantocitos, es un marcador morfológico importante de sangrado glomerular o tubular. Su cuantificación ayuda en el diagnóstico y manejo del paciente. Cuando se examinen orinas de mujeres, es importante evitar la contaminación con sangre menstrual.

Los eritrocitos miden, aproximadamente, 7 μm de diámetro, tienen forma de discos biconcavos los cuales aparecen de un color amarillo pálido cuando se examinan bajo microscopía de campo claro. En ocasiones, las tiras reactivas pueden detectar hemoglobina en ausencia de eritrocitos en el examen microscópico. Una posible explicación de esta discrepancia es la presencia de orinas alcalinas o hipotónicas, ambas pueden causar lisis de los eritrocitos. En ausencia de estas condiciones, es muy sugestivo que el pigmento que aparece en la orina (puede ser hemoglobina o mioglobina) se origine por filtración desde la sangre.⁽²¹⁾

Leucocitos.

La velocidad de excreción normal de eritrocitos en la orina es de 1 leucocito por cada 3 campos con objetivo de alto aumento, 3000 células/mL, o más de 200,000 células/hora. Un elevado número de leucocitos (piuria) está asociado a numerosos procesos inflamatorios e infecciosos del tracto urinario. La mayoría de los leucocitos vistos por microscopía de campo claro son neutrófilos segmentados. La identificación de linfocitos, células plasmáticas, y eosinófilos requiere de coloraciones especiales.

Se ha mostrado que una velocidad de excreción en exceso de 400,000 células/hora siempre indica una infección del tracto urinario. Esta velocidad corresponde a más de 10 neutrófilos por campo de alto poder. Los pacientes con infecciones activas del tracto urinario superior tienen, frecuentemente, más de 50

neutrófilos por campo de alto poder o una velocidad de excreción de leucocitos que excede 2 o aún 3 millones/hora.⁽²¹⁾

Células del epitelio tubular renal.

En el nefrón están alineados varios tipos de células del epitelio tubular renal y las células enfermas o viejas están constantemente siendo arrojadas a la orina. Aunque ellas representan la exfoliación renal real, la presencia de más de dos células del epitelio tubular renal por campo de alto aumento indican daño o lesión activa de los túbulos renales.

Hay grandes dificultades en la identificación precisa de las células de los túbulos renales, especialmente, para diferenciarlas de las células mononucleares comúnmente encontradas en la orina. Por microscopía de campo claro, las células tubulares renales son poligonales y de tamaño ligeramente menor que los leucocitos.⁽²¹⁾

Cuerpos grasos ovals.

Los cuerpos grasos ovals son células del epitelio tubular renal que están llenas de lípidos absorbidos o que han sufrido cambios degenerativos celulares. A menudo los cuerpos grasos ovals son asociados con proteinuria y lipiduria y son característicos del síndrome nefrótico y diabetes mellitus.⁽²¹⁾

Células epiteliales de transición.

En la orina normal se pueden encontrar unas pocas células de transición (uroteliales). Un gran número de células transicionales puede indicar procesos inflamatorios de la vejiga, cateterización o estados patológicos malignos

Por microscopía de campo claro, las células transicionales aparecen redondas u ovaladas, miden de 40 a 60 μm , y tienen un núcleo localizado centralmente. Los bordes citoplásmicos de esas células aparecen engrosados y rígidos. Cuando los núcleos de las células transicionales llegan a agrandarse o a tornarse irregulares, se recomienda emplear técnicas citológicas con el fin de detectar enfermedades malignas del sistema urinario.⁽²¹⁾

Células epiteliales escamosas.

Las células epiteliales escamosas se alinean en la porción distal del tracto urinario inferior y en el tracto genital femenino. Las células escamosas son las células más grandes encontradas en la orina. Tienen un citoplasma grande y plano con un núcleo pequeño. Frecuentemente, una o más hileras de esas células pueden plegarse. La presencia de células escamosas en la orina usualmente indica contaminación (vaginal, en mujeres y uretral en hombres no circuncidados) o metaplasia escamosa de la vejiga, y representan el tipo menos importante de células epiteliales encontradas en la orina.⁽²¹⁾

Fragmentos de tejidos en la orina.

En la orina, pueden observarse algunos conglomerados o fragmentos de material de apariencia sólida. Debido a su gran tamaño, este material es identificado en la inspección inicial de la orina. Es de color generalmente blanco o bronceado. Es muy importante establecer la identidad de este material para un diagnóstico seguro. Esto implica transferirlo a un fijador apropiado con el fin de preservarlo para una evaluación citológica o histológica. La necrosis papilar renal o los tumores de la vejiga son las entidades más frecuentemente responsables de desprender grandes fragmentos de tejido en la orina.⁽²¹⁾

Espermatozoides.

Los espermatozoides pueden ser fácilmente reconocidos en la orina de un hombre después de la eyaculación o en la orina de una mujer por contaminación vaginal después del coito. Su identificación es de limitada importancia clínica y la presencia de espermatozoides, generalmente, no es reportada.⁽²¹⁾

Cilindros renales.

Los cilindros renales (urinarios) son estructuras cilíndricas que se organizan en el nefrón y su importancia proviene de su localización. Están formados por uromucoide (mucoproteína de Tamm-Horsfall), que está siempre presente en la orina, usualmente en suspensión. Este uromucoide es producido por las células del epitelio tubular renal de la sección ascendente del asa de Henle. Los cilindros se forman como consecuencia del estancamiento de la orina y de la precipitación del uromucoide. El incremento en la concentración de proteínas, sales, y un pH urinario bajo son algunos de los factores que contribuyen a su formación. Debido a que la precipitación de esta proteína depende de la concentración y composición de la orina, los cilindros se forman más fácilmente en la porción distal del nefrón y en los ductos colectores del riñón, donde la orina es más concentrada. En pacientes con proteína de Bence Jones (mieloma múltiple), los cilindros pueden formarse en los túbulos convolucionados proximales.

Estas formaciones cilíndricas presentes en la orina reflejan las formas (largas o cortas) y diámetros (delgados y gruesos) de los lúmenes de los túbulos renales en donde se formaron. Su número y propiedades cuantificables aportan valiosos indicios sobre la naturaleza de la enfermedad del parénquima renal.

Microscópicamente, los cilindros se caracterizan por la apariencia de su matriz (hialina, granular, cérea), por los constituyentes celulares (eritrocitos, leucocitos, o células del epitelio tubular renal) o por el tipo de material particulado embebido en la matriz (gránulos finos, gruesos o fibrina).

La identificación exacta de los cilindros, especialmente de los tipos celulares, es difícil cuando se hace en preparaciones húmedas no coloreadas visualizadas en microscopios bajo la luz directa o campo claro. Se necesita un microscopista hábil para evitar las interpretaciones erróneas. La visualización de los cilindros mejora con el empleo de microscopios con contraste de fases, de filtros de contraste o coloraciones especiales.

Para propósitos diagnósticos de enfermedad renal, los cilindros se han clasificado como fisiológicos o patológicos.⁽²¹⁾

Grasas.

Las grasas se encuentran en la orina de pacientes quienes han presentado embolismo graso después de lesiones severas con aplastamiento óseo, degeneración grasa del riñón o síndrome nefrótico. La grasa aparecerá en la superficie de la orina recolectada en la última parte de la micción. En el sedimento urinario se pueden encontrar células epiteliales vacuoladas. La identificación de las gotas de grasa se facilita empleando coloraciones especiales para grasa como Oil Red O o Sudán III.⁽²¹⁾

UNIDAD III

METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS Y LÍPIDOS

3.1 GLUCOSA

Método enzimático (GOD-PAD)

1.0 INTRODUCCIÓN

Los carbohidratos se definen como aldehídos y cetonas polihidroxílicos (aldosas y cetosas, respectivamente). Los carbohidratos simples como la glucosa se denominan monosacáridos. Dos monosacáridos ligados por un puente llamado glucosídico forman un disacárido. Más de dos monosacáridos unidos por puentes glucosídicos se denomina polisacárido. Los carbohidratos de la dieta consisten de monosacáridos tales como la glucosa, fructosa y galactosa; de disacáridos tales como la sacarosa, lactosa y maltosa y de polisacáridos tales como el almidón. Las enzimas intestinales convierten a los disacáridos y polisacáridos en monosacáridos.

La principal función bioquímica de la glucosa es la de proporcionar energía para los procesos de la vida. El adenosín trifosfato ("ATP") es la fuente de energía universal para las reacciones biológicas. La oxidación de la glucosa por las vías glucolítica y del ácido cítrico es la fuente principal de energía para la biosíntesis del ATP.

El sistema para regular los niveles de glucosa sanguínea funciona para lograr dos fines. El primero es para almacenar glucosa en exceso en relación a las necesidades corporales inmediatas en un reservorio compacto (glucógeno) y el segundo es para movilizar la glucosa almacenada de manera que mantenga el nivel de glucosa sanguínea. La regulación de la glucosa sanguínea es esencial para mantener al cerebro, cuya fuente energética primaria es la glucosa, abastecido por una cantidad constante de la misma. La función de la insulina es desviar la glucosa extracelular a los sitios de almacenamiento intracelular en la forma de macromoléculas (como el glucógeno, lípidos y proteínas). Es así que la glucosa es almacenada en tiempos de abundancia para los momentos de necesidad.

En respuesta a la baja glucosa en sangre, como en períodos de ayuno, una serie de agentes hiperglucemiantes actúa en las vías metabólicas intermediarias para formar glucosa a partir de las macromoléculas almacenadas. De esta forma las proteínas y el glucógeno son metabolizados para formar glucosa-6-fosfato (gluconeogénesis), la cual es hidrolizada a glucosa en el hígado y liberada a la sangre para mantener los niveles de glucosa sanguínea.

Los agentes hiperglucemiantes más importantes son el glucagón, la epinefrina, el cortisol, la tiroxina, la hormona de crecimiento y ciertas hormonas intestinales. El comportamiento de cada uno de estos agentes es diferente en la regulación de la glucosa sanguínea; mientras que la insulina favorece el metabolismo anabólico (síntesis de macromoléculas), estas hormonas, en parte, inducen el metabolismo catabólico para romper grandes moléculas.⁽⁶⁾

Cuando se tiene un exceso de glucosa en la sangre por arriba del límite superior normal para una edad, se presenta la hiperglucemia. Aunque los valores altos de glucosa sérica en ayunas se relacionan con suma frecuencia con la

presencia de diabetes sacarina, el numero de enfermedades y trastornos fisiológicos que pueden llevar a incrementos mayores es vasto. El aumento de la concentración de glucosa sérica se dan en: respuesta a la tensión, enfermedad de Cushing, diabetes mellitus, acromegalia, hipertiroidismo, pancreatitis crónica, administración de algunos fármacos como diuréticos clorotiacídicos porque suprimen la secreción de insulina, coma hiperosmolar no cetónico.

La hipoglucemia es un trastorno caracterizado por una concentración de glucosa en ayunas, menor al límite inferior normal para el grupo de edad y esto sucede en: enfermedad hepática, desnutrición, posgastrectomía, tolerancia deficiente a la glucosa, administración excesiva de insulina, hipoglucemia funcional o espontánea, ingestión de alcohol en ayunas.

Debido a que la concentración de glucosa sérica por lo general se vuelve anormal sólo cuando hay un trastorno grave de esta interacción, el verificar la glucosa sérica ayuda a evaluar la función e integridad del sistema.⁽¹⁵⁾

La prueba de glucosa en ayunas evalúa de modo aproximado la capacidad del cuerpo para regular la glucosa y proporciona información acerca de la clase de anomalía, si es que la hay. No se tomarán alimentos ni bebidas, excepto agua, cuando menos por ocho horas antes de tomar la muestra.⁽⁵⁾

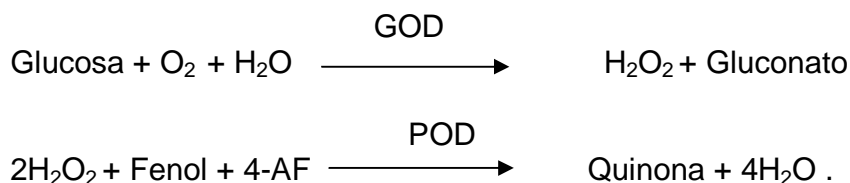
2.0 OBJETIVOS

- ✓ Destacar la importancia de la glucosa en el metabolismo humano y su relación con diversas patologías.
- ✓ Determinar la concentración de glucosa en estado basal y posprandial en una muestra biológica mediante el método enzimático colorimétrico.

3.0 FUNDAMENTO DEL MÉTODO

La enzima glucooxidasa cataliza la oxidación de glucosa a gluconato y peróxido de hidrógeno. La concentración de glucosa es proporcional al H_2O_2 , este puede medirse apareándolo con un indicador de peroxidasa.

La determinación de glucosa se efectúa mediante el método de Trinder según las siguientes reacciones:



Abreviaturas: GOD = Glucosa oxidasa

POD = Peroxidasa
4-AF = 4-aminofenazona.⁽¹⁴⁾

4.0 PREPARACIÓN

4.1 MUESTRA CLÍNICA:

- ✓ Suero o plasma venoso.
- ✓ La muestra debe recolectarse en ayuno excepto por el agua, durante ocho horas cuando menos antes de la prueba.
- ✓ La muestra debe recolectarse en tubo colector de tapón rojo para suero el cual no contiene anticoagulante, o de color lila el cual contiene EDTA anticoagulante para obtener plasma.
- ✓ La muestra debe centrifugarse a 3500 rpm durante 5 min para separar el suero y plasma.⁽⁹⁾
- ✓ La glucosa en suero o plasma es estable al menos 3 días a 2-8°C.⁽¹⁴⁾

Nota:

- ✓ Los anticoagulantes de uso corriente como la EDTA, oxalato, heparina o fluoruro no afectan los resultados.
- ✓ La hemólisis hasta 0,3 g/dL de hemoglobina no interfiere.⁽¹⁴⁾
- ✓ La muestra es inaceptable si:
 - a) Si el suero se obtiene turbio.
 - b) Si la identificación es inadecuada.
 - c) Si el tubo de recolección no es el adecuado.
 - d) Cuando se haya excedido el tiempo máximo de análisis permisible.⁽⁹⁾
- ✓ No se han observado interferencias por hemoglobina(4 g/L); bilirrubina (20mg/L); creatinina (100mg/L), galactosa (1g/L).⁽¹⁴⁾

4.2 REACTIVOS

| | | |
|-----------------------|-----------------|------------|
| REACTIVO 1 | TRIS pH 7.4 | 92 mmol/L |
| Tampón | Fenol | 0.3 mmol/L |
| REACTIVO 2 | Glucosa oxidasa | 15000 U/L |
| Vial de enzimas | Peroxidasa | 1000 U/L |
| | 4-Aminofenazona | 2.6 mmol/L |
| ESTÁNDAR | Sol. Glucosa | 100 mg/L |
| CONTROL NORMAL | Spinreact. | |

Preparación:

- ✓ Disolver los enzimas del R.2 en el contenido del R.1.
- ✓ Esta solución monorreactiva es estable 1 mes a 2-8°C ó 7 días a 15 – 25°C, al abrigo de la luz.

Nota:

- ✓ Cada reactivo deberá ser etiquetado: colocar las iniciales de la persona que lo preparó, contenido, concentración, número de lote, fecha de preparación, fecha de caducidad y requerimientos de almacenamiento.
- ✓ No usar reactivos fuera de la fecha indicada.
- ✓ No pipetee los reactivos con la boca y evite el contacto con piel y ojos.⁽¹⁴⁾

4.3 EQUIPO

- ✓ Espectrofotómetro o analizador para lecturas de 490-550 nm.
- ✓ Centrifuga.

4.4 MATERIAL

5 Tubos de ensayo de 13 X100mm.
1 micropipetas de 1.0 mL.
1 Micropipeta de 10 μ L.
Puntas para micropipeta.
Gradilla.

5.0 PROCEDIMIENTO**5.1 CONDICIONES DE ENSAYO**

- ✓ Longitud de onda: 505nm (490-550)
- ✓ Temperatura: 30/37°C
- ✓ Cubeta: 1cm. Paso de luz
- ✓ Ajuste a cero con blanco de reactivo.

5.2 DESARROLLO DE LA PRÁCTICA:

1. Pipetear en tubos de ensayo:

| | Blanco | Estándar | Muestra | Muestra Control |
|-----------------|--------|------------|------------|-----------------|
| Estándar | -- | 10 μ L | -- | -- |
| Muestra | -- | -- | 10 μ L | -- |
| Muestra Control | -- | -- | -- | 10 μ L |
| Reactivo | 1.0mL | 1.0mL | 1.0mL | 1.0mL |

2. Mezclar e incubar 10 min a 37°C ó 30 min a temperatura ambiente.

3. Leer la absorbancia (A) a 505nm.

4. Coloración estable 30 minutos a temperatura ambiente.⁽¹⁴⁾

6.0 RESULTADOS**6.1 CÁLCULOS:**

$$\text{mg /dL Glucosa} = \frac{\text{Abs. Muestra}}{\text{Abs. Estándar}} \times \text{Conc. estándar.}$$

mg/dL x 0.0555 = mmol
Concentración del estándar: 100 mg/dL.⁽¹⁴⁾

6.2 LINEALIDAD DEL MÉTODO:

- ✓ El método es lineal hasta valores de 500 mg/dL.
- ✓ Si la concentración de glucosa es superior, diluir la muestra a 1:2 con solución salina 0.9% y multiplicar el resultado por 2.⁽¹⁴⁾

7.0 VALORES DE REFERENCIA

| | | |
|----------------------------|--------|--------------------------|
| | mg/dL | mmol/L |
| ✓ Suero o plasma | 55-110 | 3.05 - 6.11 |
| ✓ Neonato nacido a término | 30-60 | 1.07-3.3 ⁽¹⁴⁾ |

3.2 COLESTEROL TOTAL Método enzimático (GOD-PAD)

1.0 INTRODUCCIÓN

El colesterol es una sustancia hidrófoba, insoluble en medio acuoso y por tanto insoluble en el plasma sanguíneo.

El colesterol se sintetiza sobre todo en el hígado, pero también en la piel, intestino, glándulas suprarrenales, el ovario, el testículo, el riñón y el pulmón. Todas las sustancias que en el organismo producen ácido acético pueden ser precursoras del colesterol (ácidos grasos, glucosa, algunos aminoácidos, etc.). El colesterol es esencial para el funcionamiento normal del organismo ya que es:

- ✓ Componente estructural esencial de membranas de todas las células animales y partículas subcelulares.
- ✓ Precursor de ácidos biliares.
- ✓ Precursor de hormonas esteroides.
- ✓ Precursor de vitamina D.

Debido a la atención que se ha dado a los alimentos libres de colesterol, es interesante observar que el organismo produce la mayor parte del colesterol en forma endógena. Las fuentes dietéticas aportan tan sólo de 150 a 300 mg diarios mientras que el hígado sintetiza 1.5 g al día. De hecho el exceso de carbohidratos y proteínas de la dieta se utiliza para producir moléculas de acetato, que posteriormente sirven para producir colesterol y ácidos grasos. Los lípidos endógenos que genera el hígado son transportados posteriormente en forma de lipoproteínas para su uso en todo el cuerpo. La circulación sistemática de colesterol es posible gracias a la formación de complejos solubles por unión a proteínas, las lipoproteínas séricas y entre ellas las de tipo β "low density lipoproteins" (LDL) son las que representan el mayor porcentaje, con aproximadamente un 60-70% del total.

El colesterol es un constituyente primario de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), pero puede encontrarse también en lipoproteínas de alta densidad (HDL) y en las de muy baja densidad (VLDL).

Las diversas lipoproteínas y apoproteínas asociadas, cuando se analizan directa o indirectamente, producen datos diagnósticos útiles para el analista, ya que es posible determinar el riesgo de coronariopatía.

Clínicamente es importante, ya que existe una relación entre la concentración del colesterol plasmático y la presencia de problemas cardíacos coronarios.

Los métodos analíticos que se emplean actualmente utilizan colesterolesera para el colesterol y permite examinar lotes grandes de muestras con exactitud y rapidez.⁽⁵⁾

Las concentraciones séricas de colesterol disminuyen en: desnutrición, esteatorrea, hepatitis, hipertiroidismo, personas con infección aguda y anemia, cáncer.

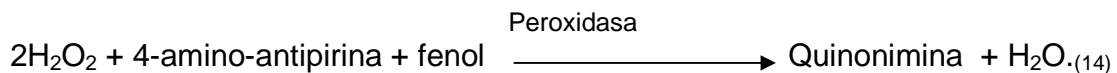
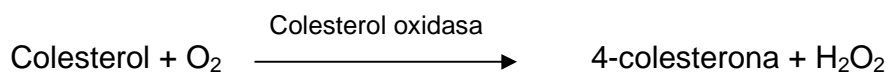
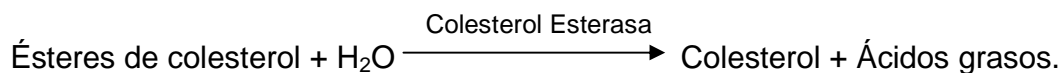
Las concentraciones séricas de colesterol aumentan en: hiperlipoproteinemia, cáncer de la cabeza del páncreas, hipotiroidismo, síndrome nefrótico, el tercer trimestre del embarazo, predisposición genética.⁽¹⁵⁾

2.0 OBJETIVOS

- ✓ Explicar la importancia del colesterol en el metabolismo humano y su relación con diversas patologías.
- ✓ Determinar la concentración de colesterol en una muestra biológica mediante el método enzimático colorimétrico.

3.0 FUNDAMENTO DEL MÉTODO

La colesterol esterasa hidroliza los ésteres de colesterol presentes en la muestra dando colesterol libre y ácidos grasos, en una posterior oxidación enzimática mediante la colesterol oxidasa se forma H_2O_2 y colestero. El H_2O_2 se valora por la reacción Trinder, mediante un cromógeno, fenol y 4-Aminoantipirina, en presencia de Peroxidasa, formando una quinonimina cuya coloración, encarnada, es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra.



4.0 PREPARACIÓN

4.1 MUESTRA CLÍNICA

- ✓ El paciente debe encontrarse en un estado fisiológico regular (sin ejercicio vigoroso) y bajo su dieta ordinaria del día anterior a la prueba.
- ✓ Suero.
- ✓ La muestra debe recolectarse en ayuno total excepto agua, durante un lapso de 12 a 14 horas antes de la prueba.
- ✓ La muestra debe recolectarse en tubo recolector al vacío de tapón rojo el cual no contiene anticoagulante.
- ✓ La muestra debe centrifugarse a 3500 rpm para separar el suero.
- ✓ La estabilidad de la muestra es de una semana guardada, tapada y a $2-8^\circ C$ ó 3 meses congelada a $-20^\circ C$. (9)

Nota:

- ✓ La muestra es inaceptable si:
 - a) Si el suero se obtiene turbio.
 - b) Si la identificación es inadecuada.

- c) Si existe hemólisis.
 - d) Si el tubo de recolección no es el adecuado.
 - e) Cuando se haya excedido el tiempo máximo de análisis permisible.
 - f) Si existen interferencias
- ✓ No interfieren en el ensayo los siguientes compuestos y concentraciones:
- | | |
|----------------|-------------|
| Ac. Úrico | 1.5 mmol/L |
| Ac. Salicílico | 3.6 mmol/L |
| Paracetamol | 0.66 mmol/L |
| Fenobarbital | 0.4 mmol/L |
| Glucosa | 28 mmol/L |
| Cafeína | 52 µmol/L |
| Ac. Nicotínico | 0.16 mmol/L |
| Cortisona | 5 mmol /L |
- El ácido Ascórbico por enzima de 300 µmol/L interfiere negativamente.⁽¹⁴⁾

4.2 REACTIVOS

- REACTIVO 1** Tampón pH 6.9 90mmol/L
Fenol 26 mmol/L
- REACTIVO 2**
Vial enzimas Peroxidasa 1250 U/L
Colesterol esterasa
Colesterol oxidasa 300 U/L
4-Aminoantipirina 0.4 mmol/L
- ESTÁNDAR** Solución Colesterol 200 mg/dL
- CONTROL NORMAL** Spinreact.

Preparación:

- ✓ Disolver con agitación suave el contenido del vial de enzimas R.2 con un poco de R.1 amortiguador, una vez disuelto el liofilizado retornar al frasco original del amortiguador, homogeneizar la solución.
- ✓ Esta solución es estable 4 meses en refrigeración 2-8°C ó 40 días a 15-25°C protegido de la luz.

Nota:

- ✓ Cada reactivo deberá ser etiquetado: las iniciales de la persona que lo preparó, el contenido, la concentración, el número de lote, la fecha de preparación, la fecha de caducidad y requerimientos de almacenamiento.
- ✓ No se deberán usar reactivos fuera de la fecha indicada.
- ✓ No se pipetearán los reactivos con la boca y evitará el contacto con piel y ojos.⁽¹⁴⁾

4.3 EQUIPO

- ✓ Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 500-550nm. El alumno debe consultar el manual del espectrofotómetro que va a utilizar para saber cuales son las instrucciones de operación y los datos y características de funcionamiento del instrumento.
- ✓ Centrifuga.
- ✓ Baño de agua a 25 o 37°C.

4.4 MATERIAL

- 5 Tubos de ensayo de 13 x 100 mm
- 1 Micropipetas de 1mL
- 1 Micropipeta de 10µL
- ✓ Puntas para micropipeta.
- ✓ Gradilla.

5.0 PROCEDIMIENTO

5.1 CONDICIONES DE ENSAYO

- ✓ Longitud de onda.....505nm (500-550)
- ✓ Cubeta.....1 cm paso de luz
- ✓ Temperatura.....25 – 37°C
- ✓ Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.

5.2 DESARROLLO DE LA PRÁCTICA

1. Pipetear en tubos de ensayo:

| | Blanco | Estándar | Muestra | Muestra Control |
|-----------------|--------|----------|---------|-----------------|
| Estándar | -- | 10µL | -- | -- |
| Muestra | -- | -- | 10µL | -- |
| Muestra Control | -- | -- | -- | 10µL |
| Reactivo al uso | 1.0mL | 1.0mL | 1.0mL | 1.0mL |

2. Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C ó 10 min a temperatura ambiente.
3. Ajustar el aparato a cero con el blanco de reactivos.
4. Leer a 505nm (500-550) la densidad óptica del estándar y de la muestra.
5. La coloración será estable durante 60 min.

Nota:

Se deberá procesar junto con las muestras algún suero control valorado con niveles normal y anormal, que le permitirá tener un control de la exactitud y precisión de los resultados.⁽¹⁴⁾

6.0 RESULTADOS

6.1 CÁLCULOS

Abs de la muestra

Abs del estándar

X Concentración del estándar (200 mg/dl) = Concentración de colesterol.

Factor de conversión: mg/dL x 0.0258 = mmol/L (SI).

6.2 LINEALIDAD DEL MÉTODO

- ✓ Hasta valores de 600 mg/dL o 15.4 mmol/L.
- ✓ Para concentraciones superiores la muestra se diluye 1:2 con solución salina 0.9%, multiplicando el resultado por 2.⁽¹⁴⁾

7.0 VALORES DE RIESGO

- ✓ Valores sospechosos desde 220 mg/dL o 5.7 mmol/L.
- ✓ Valores elevados desde 260 mg/dL o 6.7 mmol/L.⁽¹⁴⁾

3.3 TRIGLICÉRIDOS

Método enzimático (GOD-PAD)

MÉTODO ENZIMÁTICO

1.0 INTRODUCCIÓN

Las fuentes de lípidos pueden ser exógenas o endógenas, sus vías metabólicas hacia todas las áreas del organismo y procedentes de ellas constituyen una red compleja de reacciones químicas en las que participan moléculas individuales y lipoproteínas de gran tamaño.

Los triglicéridos están constituidos por glicerol y ácidos grasos. Estos forman parte de las 5 clases de lipoproteínas que transportan a los lípidos en el plasma: quilomicrones, constituidos casi totalmente por triglicéridos dietéticos; lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL); lipoproteínas de densidad intermedia (IDL); lipoproteínas de baja densidad (LDL), conocidas también como lipoproteínas beta y lipoproteínas de alta densidad (HDL), también conocidas como lipoproteínas alfa.

Aproximadamente del 40% del consumo de calorías en la dieta consta de lípidos y alrededor del 35% provienen de lípidos animales y el 5% de lípidos vegetales poli-insaturados. Los triglicéridos constituyen una porción importante del (98 a 99%) de los lípidos animales y el resto son colesterol y otros lípidos.⁽⁶⁾

Los padecimientos en los cuales predominan los triglicéridos son: xantoma eruptivo, lipemia retiniana, organomegalia, pancreatitis, intolerancia a la glucosa, hiperuricemia, aterosclerosis prematura, diabetes mellitus insulino-pénica, disglobulinemia, lupus eritematoso, embarazo, uso de hormonas, enfermedad por almacenamiento de glucógeno, alcoholismo, enfermedad de Gaucher, mieloma.

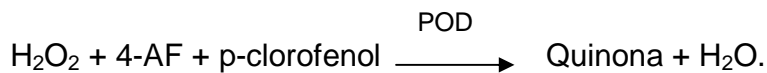
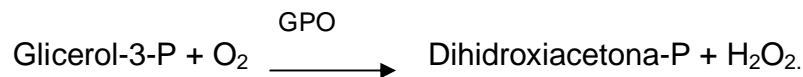
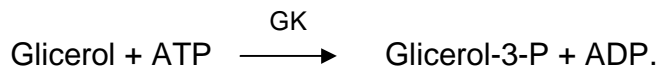
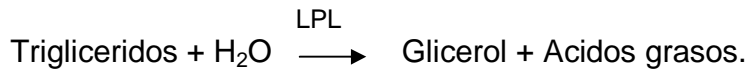
Los incrementos en los valores de triglicéridos en el infarto miocárdico pueden durar un periodo tan prolongado como de un año. Las concentraciones de triglicéridos en sí, tienen poco valor de predicción y aumentan después de la ingestión de grasa.⁽¹⁵⁾

2.0 OBJETIVOS

- ✓ Realizar la determinación de triglicéridos séricos en una muestra biológica con un método enzimático.
- ✓ Destacar la importancia de los triglicéridos en el metabolismo humano y su relación con diversas patologías.

3.0 FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Los triglicéridos son hidrolizados enzimáticamente a glicerol, el cual, mediante Glicerol cinasa y Glicerol-P-oxidasa, libera el peróxido de hidrógeno que se valora mediante la reacción de Trinder, de acuerdo a las siguientes reacciones.



La cantidad de la quinona formada es proporcional a la concentración de triglicéridos.

Abreviaturas: LPL = Lipoproteinlipasa; GK = Glicerol Cinasa ; GOP = Glicerol-P-oxidasa; POD = Peroxidasa.⁽¹⁴⁾

4.0 PREPARACIÓN

4.1 MUESTRA CLÍNICA

- ✓ Suero
- ✓ El paciente deberá encontrarse en un estado fisiológico regular (sin ejercicio vigoroso) y bajo su dieta ordinaria del día anterior a la prueba.
- ✓ La muestra debe recolectarse en ayuno total de 12 a 14 horas antes de la prueba, excepto agua.
- ✓ La muestra debe recolectarse en tubo recolector al vacío de tapón rojo el cual no contiene anticoagulante.

Para separar el suero la muestra debe centrifugarse durante 10 minutos a 3500rpm.⁽⁹⁾

Nota:

- ✓ Los triglicéridos son estables en suero 3 días a 2-8°C o una semana a 15-25°C.⁽¹⁴⁾
- ✓ La muestra será inaceptable si:
 - a) Si el suero se obtiene turbio.
 - b) Si la identificación es inadecuada.
 - c) Si existe hemólisis.
 - d) Si el tubo de recolección no es el adecuado.
 - e) Cuando se haya excedido el tiempo máximo de análisis permisible.⁽⁹⁾

4.2 REACTIVOS

| | | |
|-----------------------|--------------------|------------|
| REACTIVO 1 | Tampón GOOD pH 7.5 | 50mmol/L |
| Tampón | p-clorofenol | 2mmol/L |
| REACTIVO 2 | Lipoproteinlipasa | 150000 U/L |
| Vial enzimas | Glicerol Kinasa | 500 U/L |
| | Glicerol-P-oxidasa | 2500 U/L |
| | Peroxidasa | 440 U/L |
| | 4-Aminofenazona | 0.1 mmol/L |
| | ATP | 0.1 mmol/L |
| ESTÁNDAR | Sol. Triglicéridos | 200 mg/dL |
| CONTROL NORMAL | Spinreact. | |

Preparación:

- ✓ Disolver el contenido del vial enzimas R.2 en el frasco de solución tampón R.1

Nota:

- ✓ El reactivo al uso es estable 6 semanas a 2-8°C o una semana a 15-25°C.
- ✓ Cada reactivo deberá ser etiquetado con los siguientes datos: iniciales de la persona que lo preparó, contenido, concentración, número de lote, fecha de preparación, fecha de caducidad y requerimientos de almacenamiento.
- ✓ Los reactivos no deberán utilizarse fuera de la fecha indicada.
- ✓ No se deberán pipetear los reactivos con la boca y se debe evitar el contacto con piel y ojos.⁽¹⁴⁾

4.3 EQUIPO

- ✓ Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 500-550nm. El alumno deberá consultar el manual del espectrofotómetro que va a utilizar para aplicar correctamente las instrucciones de operación, datos y características de funcionamiento del instrumento.
- ✓ Centrifuga.
- ✓ Baño de agua a 25 o 37°C.

4.4 MATERIAL

5 Tubos de ensayo de 13 x 100 mm
 1 Micropipetas de 1mL
 1 Micropipeta de 10µL
 Puntas para micropipeta.
 Gradilla.

5.0 PROCEDIMIENTO

5.1 CONDICIONES DE ENSAYO

- ✓ Longitud de onda.....505nm (490-550)

- ✓ Temperatura: 25/ 30/37°C
- ✓ Cubeta.....1 cm paso de luz
- ✓ Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.

5.2 DESARROLLO DE LA PRÁCTICA:

1. Pipetear en tubos de ensayo:

| | Blanco | Estándar | Muestra | Muestra Control |
|-----------------|--------|----------|---------|-----------------|
| Estándar | -- | 10µL | -- | -- |
| Muestra | -- | -- | 10µL | -- |
| Muestra Control | -- | -- | -- | 10µL |
| Reactivo al uso | 1.0mL | 1.0mL | 1.0mL | 1.0mL |

2. Mezclar e incubar 5 min a 37°C ó 10 min a temperatura ambiente.
3. Medir la densidad óptica a 505 nm (490-550), frente al blanco de reactivos.
4. El color será estable durante 30 min.⁽¹⁴⁾

6.0 RESULTADOS

6.1 CÁLCULOS

$$\frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del estándar}} \times \text{Conc. del estándar} = \text{Conc. muestra}$$

Factor de conversión: mg/dL X 0.0113 = mmol/L
 Conc. Estándar: 200mg/dL.

6.2 LINEALIDAD DEL MÉTODO

- ✓ El método es lineal hasta valores de 1000mg/dL (11.3mmol/L).
- ✓ Para concentraciones superiores se deberá diluir la muestra a 1:2 con solución salina 0.9%, multiplicando el resultado por 2.⁽¹⁴⁾

7.0 VALORES DE REFERENCIA

- ✓ Valores sospechosos a partir de 150 mg/dL (1.7 mmol/L).
- ✓ Valores elevados a partir de 200 mg/dL (2.26 mmol/L).⁽¹⁴⁾

UNIDAD IV

UNIDAD IV METABOLISMO OSEO Y MINERAL

4.1 CALCIO Método Colorimétrico 1.0 INTRODUCCIÓN

El calcio y el metabolismo mineral representan un delicado y complejo proceso biológico que comprende muchos componentes interrelacionados. El metabolismo homeostático normal depende de la disponibilidad de los substratos minerales y de las interacciones de los tejidos como los del hueso, el riñón y el tracto gastrointestinal con las hormonas calciotrópicas HPT, calcitonina (CT).

El calcio es el quinto elemento más abundante en el cuerpo humano. El cuerpo humano contiene cerca de 1200 g de calcio en las personas adultas y aproximadamente 28 g en los neonatos (recién nacidos a término). Casi todo el calcio del cuerpo (99%) reside en el hueso. El remanente reside en los fluidos del cuerpo y tiene un papel crítico muy importante en un sin número de procesos fisiológicos incluyendo la contracción muscular, la neurotransmisión, el transporte de membrana, las reacciones enzimáticas, la secreción hormonal y la coagulación sanguínea. En la circulación, el calcio existe en tres formas: 45% del calcio sérico total es la forma biológicamente activa de calcio iónico, 45% está unido a la proteína principalmente albúmina y 10% está unido a complejos aniónicos (fosfato, lactato, citrato).

La acidez gástrica, la aportación suficiente de vitamina D, son factores que regulan la absorción y retención del calcio. En el adulto, el calcio dietético es absorbido por el intestino mediante proteínas específicas unidas al calcio. Este proceso está bajo el control activo de la vitamina D. La mayoría del calcio que se absorbe se deposita en los huesos. La principal ruta de excreción de calcio en el cuerpo es a través de los riñones.⁽¹⁸⁾

Se encuentran valores altos de calcio en el hiperparatiroidismo, lesiones osteolíticas, acidosis tubular renal y se encuentra disminuido en el hipoparatiroidismo, raquitismo, insuficiencia renal.⁽¹⁵⁾

2.0 OBJETIVOS

- ✓ Determinar la concentración de calcio en una muestra biológica mediante el método analítico colorimétrico cresolftaleína complexona.
- ✓ Conocer la importancia del calcio en el metabolismo humano y su relación con diversas patologías.

3.0 FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El calcio con la cresolftaleína en un medio alcalino forma un complejo violeta, cuya intensidad de color es directamente proporcional a la cantidad de calcio existente en la muestra.⁽¹⁴⁾

4.0 PREPARACIÓN

4.1 MUESTRA CLÍNICA

- ✓ Suero
- ✓ La muestra debe recolectarse en ayuno.
- ✓ La muestra debe recolectarse en tubo colector de tapón rojo.
- ✓ La muestra debe centrifugarse a 3500 rpm durante 5 min para separar el suero.⁽⁹⁾
- ✓ El calcio en suero permanece estable durante: 10 días a 2-8°C ó durante 8 meses a -20°C.⁽¹⁴⁾

Nota:

- ✓ Se recomienda utilizar material de plástico de un solo uso para evitar contaminaciones. En caso de utilizar material de vidrio deberá lavarse con ácido nítrico diluido a la mitad con agua destilada, enjuagar varias veces con agua destilada y secar antes de su uso.
- ✓ Trazas de detergente utilizados en el laboratorio pueden quelar la reacción e invalidarán la determinación.
- ✓ No se deben emplear plasmas obtenidos con agentes anticoagulantes que se complejan con el calcio, como EDTA, oxalato, ..
- ✓ Al obtener el suero se deberá separar el coágulo lo antes posible, para evitar el trasiego de iones calcio hacia los hematíes.⁽¹⁴⁾
- ✓ La muestra es inaceptable si:
 - a) Si el suero se obtiene turbio.
 - b) Si la identificación es inadecuada.
 - c) Si el tubo de recolección no es el adecuado.
 - d) Cuando se haya excedido el tiempo máximo de análisis permisible.⁽⁹⁾

4.2 REACTIVOS

REACTIVO 1 Tampón etanolamina 500 mmol/L

REACTIVO 2 Cresolftaleína 0.62 mmol/L

Cromógeno 8-hidroxiquinoleína 69 mmol/L

STANDAR Sol. Calcio 10 mg/dL

CONTROL NORMAL Spinreact.

Preparación:

- ✓ Mezclar según la proporción: 50 vol. de R.1 y 1 vol. de R.2.
- ✓ La estabilidad del reactivo es de 5 días a 2-8°C.

Nota:

- ✓ En refrigeración ambos reactivos pueden permanecer estables hasta su fecha de caducidad, indicada en el envase.

- ✓ Cada reactivo deberá ser etiquetado con los siguientes datos: las iniciales de la persona que lo preparó, el contenido, la concentración, el número de lote, la fecha de preparación, la fecha de caducidad y requerimientos de almacenamiento.
- ✓ No se deberán usar reactivos fuera de la fecha indicada.
- ✓ No se pipetearán los reactivos con la boca y debe evitar el contacto con piel y ojos.⁽¹⁴⁾

4.3 EQUIPO

- ✓ Espectrofotómetro o analizador para lecturas de 550-590 nm. El alumno deberá consultar el manual del espectrofotómetro que va a utilizar para la aplicación correcta de las instrucciones de operación, datos y características de funcionamiento del instrumento.
- ✓ Centrifuga.

4.4 MATERIAL

5 Tubos de ensayo de 13 X100mm.
 1 Micropipetas de 1.0 mL.
 1 Micropipeta de 10 μ L.
 Puntas para micropipeta.
 Gradilla.

5.0 PROCEDIMIENTO

5.1 CONDICIONES DE ENSAYO

- ✓ Longitud de onda: 570nm (550-590)
- ✓ Temperatura: 25/ 30/37°C
- ✓ Cubeta: 1cm. Paso de luz
- ✓ Ajuste a cero con blanco de reactivo.

5.2 DESARROLLO DE LA PRÁCTICA

1. Pipetear en tubos de ensayo:

| | Blanco | Estándar | Muestra | Muestra Control |
|-----------------|--------|------------|------------|-----------------|
| Estándar | -- | 10 μ L | -- | -- |
| Muestra | -- | -- | 10 μ L | -- |
| Muestra Control | -- | -- | -- | 10 μ L |
| R.1 Tampón | 1.0ml | 1.0ml | 1.0ml | 1.0ml |
| R.2 Color | 1 gota | 1 gota | 1gota | 1gota |

2. Mezclar y esperar 5 min. a temperatura ambiente.
3. Leer frente a blanco de reactivos.

4. Coloración estable 40 minutos.⁽¹⁴⁾

6.0 RESULTADOS

6.1 CÁLCULOS

$$\text{mg /dL Calcio} = \frac{\text{Abs. Muestra}}{\text{Abs. Estándar}} \times \text{Conc. Estándar.}$$

$$\text{mg/dL} \times 0.25 = \text{mmol.}^{(14)}$$

6.2 LINEALIDAD DEL MÉTODO

- ✓ El método es lineal hasta valores de 15 mg/dL.
- ✓ Si la concentración de calcio es superior, diluir la muestra a 1:2 con solución salina 0.9% y multiplicar el resultado por 2.⁽¹⁴⁾

7.0 VALORES DE REFERENCIA

- ✓ Suero recién nacidos 8.0-13.0 mg/dL (2.00-3.25 mmol/L).
- ✓ Niños 10.0-12.0 mg/dL (2.50-3.00 mmol/L).
- ✓ Adultos 9.0-11.0 mg/dL (2.25-2.75 mmol/L).⁽¹⁴⁾

4.2 FÓSFORO

1.0 INTRODUCCIÓN

El hueso en humanos contiene de 80 a 85% del fósforo corporal total; aparentemente 9% se encuentra en músculo y el resto está en las vísceras y líquido extracelular. La concentración intracelular de fósforo (fosfatos y fósforo inorgánico) es mayor que la de los niveles extracelulares. El fósforo abunda en el organismo como anión intracelular y extracelular. Intracelularmente, existe en forma de fosfato orgánico en combinación con lípidos y proteínas. En forma de fosfolípidos y fosfoproteínas, el fósforo es esencial para la integridad estructural de la membrana celular y es un componente importante de los ácidos nucleicos y de los nucleótidos de alta energía como ATP. La mayor parte del fosfato extracelular

(850) % se localiza en los huesos, donde se combina con el calcio en la hidroxiapatita. Casi 85% del fosfato sérico existe como monofosfato inorgánico o fosfato diácido. En estas formas actúa como principal amortiguador del sistema urinario para facilitar la excreción de H⁺. El restante 12 a 15% está enlazado con proteínas. El fósforo del suero existe principalmente en forma de fosfato inorgánico.⁽¹⁸⁾

La hiperfosfatemia es muy a menudo el resultado de la disminución de la excreción renal de los iones fosfatos, como ocurre en la insuficiencia renal aguda y crónica, particularmente cuando la relación de la filtración glomerular está reducida en menos del 25% de lo normal. La hiperfosfatemia también puede resultar de un aumento de la carga de fosfato corporal, la cual puede en turno resultar de los enemas y los laxantes conteniendo fosfatos, transfusiones de sangre o hiperalimentación, como el resultado de la destrucción masiva celular posterior a la lisis por terapia citotóxica (síndrome de lisis tumoral), o por lesiones de tejido (hipertermia, hipoxia, o lesiones por choque), las cuales resultan en randomiolísis y hemólisis. La reabsorción tubular renal de fosfatos es responsable de la hiperfosfatemia observada en el hipoparatiroidismo, hipertiroidismo, hipogonadismo y exceso de hormona de crecimiento. La hipofosfatemia moderada, la cual se define como la concentración de fósforo en suero entre 10 y 25 mg/L en los adultos, es generalmente asintomática. En los niños, las concentraciones de fósforo en suero por abajo de 40 mg/L son a menudo consideradas anormales. La hipofosfatemia puede resultar de una disminución en la reabsorción intestinal de fosfato o por un aumento en la pérdida urinaria de fosfatos y un desplazamiento endógeno del fósforo inorgánico de los compartimientos de los fluidos extracelulares a los intracelulares.⁽⁶⁾

2.0 OBJETIVOS

- ✓ Determinar la concentración de fósforo en una muestra biológica mediante el método analítico fosfomolibdato UV.
- ✓ Conocer la importancia del fósforo en el metabolismo humano y su relación con diversas patologías.

3.0 FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El fósforo es cuantificado según la reacción siguiente:

Molibdato amónico + Sulfúrico \longrightarrow Complejo fosfomolibdato

La absorción máxima del complejo se mide a 340 nm.⁽¹⁴⁾

4.0 PREPARACIÓN

4.1 MUESTRA CLÍNICA

- ✓ Suero
- ✓ La muestra debe recolectarse en ayuno.
- ✓ La muestra debe recolectarse en tubo colector de tapón rojo.
- ✓ La muestra debe centrifugarse a 3500 rpm durante 5 min para separar el suero.⁽⁹⁾
- ✓ El fósforo en suero es estable durante 10 días a 2-8°C ó 8 meses a – 20°C.⁽¹⁴⁾

Nota:

- ✓ Se recomienda utilizar material de plástico de un solo uso para evitar contaminaciones.
- ✓ La muestra es inaceptable si:
 - a) Si el suero se obtiene turbio.
 - b) Si el suero presenta hemólisis.
 - c) Si la identificación es inadecuada.
 - d) Si el tubo de recolección no es el adecuado.
 - e) Cuando se haya excedido el tiempo máximo de análisis permisible.⁽⁹⁾

4.2 REACTIVOS

Los reactivos son proporcionado por la casa comercial SPINREACT, código 1001155.

REACTIVO Acido sulfúrico 210 mM
 Molibdato amónico 0.40 mM
 Detergente

ESTÁNDAR Sol. Fósforo 5.0 mg/dL

CONTROL NORMAL Spinreact.

Nota:

- ✓ El reactivo está preparado para su uso.
- ✓ Cada reactivo deberá ser etiquetado con los siguientes datos: las iniciales de la persona que lo preparó, el contenido, la concentración, el número de lote, la fecha de preparación, la fecha de caducidad y requerimientos de almacenamiento.
- ✓ No se deberán usar reactivos fuera de la fecha indicada.
- ✓ No se pipetearán los reactivos con la boca y se evitará el contacto con piel y ojos.⁽¹⁴⁾

4.3 EQUIPO

- ✓ Espectrofotómetro o analizador para lecturas de 340nm. El alumno deberá consultar el manual del espectrofotómetro que va a utilizar para aplicar correctamente las instrucciones de operación, datos y características de funcionamiento del instrumento.
- ✓ Centrifuga.

4.4 MATERIAL

5 ubos de ensaye de 13 X100mm.
1 Micropipetas de 1.0 mL.
1 Micropipeta de 10 μ L.
Puntas para micropipeta.
Gradilla.

5.0 PROCEDIMIENTO

5.1 CONDICIONES DE ENSAYO

- ✓ Longitud de onda: 340 nm
- ✓ Temperatura: 25/ 30/37°C
- ✓ Cubeta: 1cm. Paso de luz
- ✓ Ajuste a cero con blanco de reactivo.

5.2 DESARROLLO DE LA PRÁCTICA

1. Pipetear en tubos de ensayo:

| | Blanco | Estándar | Muestra | Muestra Control |
|-----------------|--------|------------|------------|-----------------|
| Estándar | -- | 10 μ L | -- | -- |
| Muestra | -- | -- | 10 μ L | -- |
| Muestra Control | -- | -- | -- | 10 μ L |
| Reactivo | 1.0mL | 1.0mL | 1.0mL | 1.0mL |

2. Mezclar e incubar exactamente 5 min a 25/ 30/37°C.

3. Leer frente a blanco de reactivos.⁽¹⁴⁾

6.0 RESULTADOS

6.1 CÁLCULOS

$$\frac{\text{Abs. muestra}}{\text{Abs. estándar}} \times \text{conc. estándar} = \text{concentración de fósforo}$$

$$\text{mg/dL} \times 0.323 = \text{mmol/ L}$$

Conc. estándar : 5.0 mg/dL (1.8 mmol/L).⁽¹⁴⁾

6.2 LINEALIDAD DEL MÉTODO

- ✓ El método es lineal hasta valores de 15 mg/dL (4.84 mmol/L).
- ✓ Si la concentración de la muestra es superior, se diluirá a 1:2 con agua destilada y el resultado final se multiplicará por 2.⁽¹⁴⁾

6.3 Límite de seguridad biológica

- ✓ Mujeres 1.5-6.8 mg/dL (0.48-2.19 mmol/L).
- ✓ Hombres 2.1-5.6 mg/dL (0.68-1.80 mmol/L).
- ✓ Niños 4.0-7.0 mg/dL (1.29-2.26 mmol/L).⁽¹⁴⁾

UNIDAD V

PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO HEPÁTICO

El hígado es el órgano principal que se encarga del metabolismo de los carbohidratos, proteínas, lípidos, porfirinas y ácidos biliares. Es capaz de sintetizar la mayoría de las proteínas del cuerpo con excepción de las inmunoglobulinas, producidas por el sistema de las células plasmáticas linfocíticas. El hígado es también el sitio principal para el almacenamiento del hierro, glucógeno, lípidos y vitaminas. El hígado juega un papel importante en la desintoxicación de los xenobióticos y la excreción de los productos metabólicos finales como bilirrubina, amoníaco y urea.

Alteraciones de la función hepática durante la enfermedad

Ictericia

La ictericia es una condición general provocada por el metabolismo anormal o la retención de la bilirrubina. La ictericia le produce una coloración amarilla a la piel, membranas mucosas y escleras. Se puede observar la ictericia típicamente con niveles de bilirrubina sérica de aproximadamente 50 mg/dL. Los tres tipos principales de ictericia son: la prehepática, la hepática y la posthepática.

La *ictericia prehepática* es el resultado de las anemias hemolíticas agudas o crónicas. La *ictericia hepática* incluye los trastornos del metabolismo de la bilirrubina y los defectos en el transporte tales como: la enfermedad de Crigler-Najer, el síndrome de Dubin-Johnson y la enfermedad de Gilbert, así como la ictericia fisiológica del recién nacido y enfermedades que provocan la injuria o la destrucción hepatocelular.

Cada una de las enfermedades específicas del metabolismo de la bilirrubina representa un defecto en una de las etapas del procesamiento hepático de la bilirrubina sérica. Por lo tanto, la *enfermedad de Gilbert* es causada por un defecto en el transporte de la bilirrubina de la albúmina plasmática al hepatocito. Aunque se presentan niveles elevados de bilirrubina no conjugada en este desorden familiar, no se elevan los niveles de bilirrubina conjugada. Un daño en la conjugación con el UDP- glucorónido, causada por una deficiencia de la enzima UDP-glucoroniltransferasa también provocará un incremento grande en la bilirrubina no conjugada. Cuando la deficiencia congénita, se conoce como la *enfermedad de Crigler-Najer*.

Sin embargo, las deficiencias en la glucoronil transferasa se encuentran con mayor frecuencia en la *ictericia neonatal o fisiológica*. La actividad de esta enzima es una de las últimas funciones que se activan en la vida prenatal, ya que la bilirrubina no conjugada formada por el feto es eliminada por la placenta a la sangre materna.

La última etapa en el procesamiento hepático de la bilirrubina es la etapa de postconjugación en la cual se excreta el glucorónido de bilirrubina de los microsomas hepáticos a los canalículos. La dificultad en realizar este proceso, llamado el *síndrome de Dubin-Johnson*, provoca grandes incrementos en la bilirrubina conjugada sérica y la orina muestra presencia de bilirrubina.

Se ha promocionado la medición de la bilirrubina delta como una mejor manera de evaluar la hiperbilirrubinemia resultante de la enfermedad hepática obstructiva. La fracción tiene una vida media sérica mayor que las otras fracciones. Si se encuentra elevada en concentraciones significativas, puede provocar un descenso aparentemente más lento en la caída de la bilirrubina sérica dando una falsa impresión de una falta de progreso a medida que la enfermedad hepática responde al tratamiento.

La ictericia hepática incluye los desórdenes caracterizados por daño hepatocelular o necrosis, tales como hepatitis o cirrosis. La *ictericia posthepática* es causada generalmente por una enfermedad obstructiva biliar provocada por espasmos o contracciones del tracto biliar, la oclusión dúctil por cálculos o compresión por enfermedad neoplásica. Puesto que en estas enfermedades las funciones hepáticas de transporte y conjugación de la bilirrubina son normales, el incremento mayor en la bilirrubina sérica implica a la fracción conjugada. Debido a la imposibilidad de ser excretada adecuadamente por el hígado, en estos desórdenes aumenta la fracción de bilirrubina conjugada en el suero, con el resultado de la aparición de bilirrubina en la orina. Si la enfermedad hepatocelular es suficientemente severa para provocar ictericia, se aumentan tanto las fracciones de bilirrubina conjugadas como no conjugadas. La razón es el daño general en el metabolismo de la bilirrubina

5.1 BILIRRUBINA TOTAL Y DIRECTA. MÉTODO DMSO

1. INTRODUCCIÓN

La bilirrubina se origina por degradación del grupo hem de la hemoglobina, que a su vez aparece en el plasma como consecuencia de la destrucción de los glóbulos rojos en el sistema retículo endotelial. La hemoglobina, una vez liberada en el interior del eritrocito, se combina con las haptoglobinas, proteínas plasmáticas específicas para su transporte. En una primera etapa y tras su liberación de la haptoglobina, se forma, por acción de una oxigenasa, un grupo formilo, con lo que se rompe el anillo tetrapirrólico del hem, formándose el compuesto denominado biliverdina, que en una etapa posterior y por acción de una reductasa se transforma en bilirrubina.

Desde un punto de vista analítico y clínico, interesa conocer los niveles de bilirrubina total y diferenciar cuantitativamente la "bilirrubina libre" o prehepática que aumenta principalmente en procesos de tipo hemolítico, de la "bilirrubina conjugada" o hepática que está incrementada en la disfunción hepática y más concretamente en fallos de los mecanismos de su eliminación, a través del sistema biliar, cuyo primer paso es introducirse del hepatocito a los canalículos biliares.

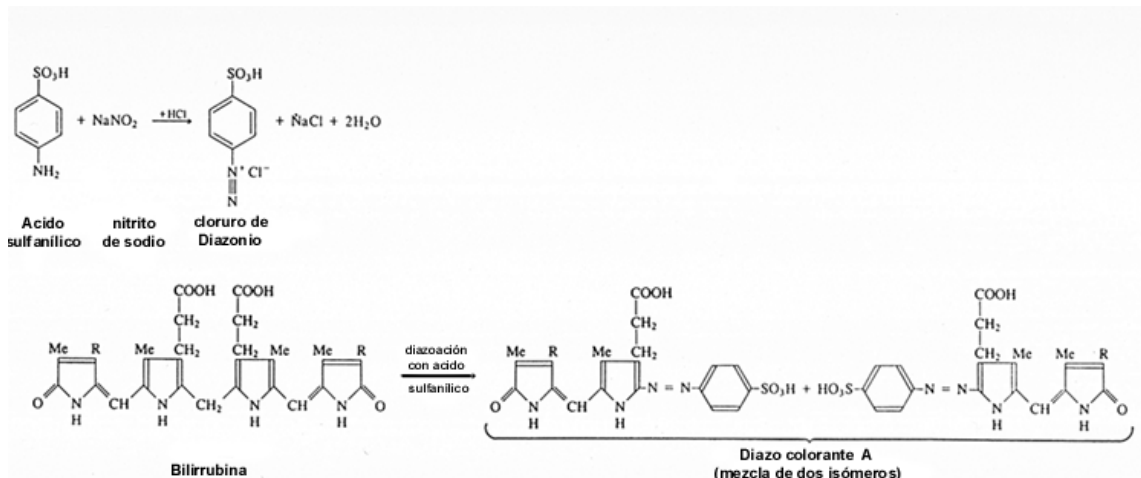
2. OBJETIVOS

- ✓ Demostrar el manejo adecuado de la técnica para la determinación de bilirrubina en una muestra biológica.
- ✓ Establecer los valores de referencia de la bilirrubina total y directa y comparar con el valor de nuestra muestra problema a analizar.
- ✓ Definir cuales son las principales patologías que se presentan si tenemos valores altos o bajos de bilirrubina en una muestra biológica.

3. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Casi todas las técnicas de cuantificación de la bilirrubina se basan en la reacción de Malloy-Evelyn, que valora colorimétricamente por la formación de azobilirrubina, de color rojo cereza, cuando a la bilirrubina se la hace reaccionar en determinadas condiciones con el ácido sulfanílico diazotado.

La bilirrubina conjugada, muy polar, reacciona en medio acuoso con el reactivo de diazotación, por lo que se le llamó directa, pues al poner en contacto el suero y el reactivo aparecía directamente el color. Sin embargo, la bilirrubina libre, poco polar, no da directamente la reacción y es preciso añadir un tercer reactivo -que inicialmente fue el metanol- para que produzca la reacción de diazotación con la consiguiente aparición del color; por este motivo se llamó bilirrubina indirecta.



4. PREPARACIÓN

4.1 MUESTRA CLINICA

Suero

La estabilidad de la muestra, una vez separada de los hematíes y protegida de la luz, es de 3 meses a -20°C, 4 días a 2-8°C o un día de 20 a 25°C

4.2 REACTIVOS Y MATERIAL

Material necesario

- 5 ubos de ensaye de 13 X100mm.
- 1 Micropipetas de 1.0 mL.
- 1 Micropipeta de 200μL.
- Puntas para micropipeta.
- Gradilla.

Fotómetro termoestable a 37°C con filtro de 546 nm.

- Reactivo 1** Acido sulfanílico 30 mmol/L
(BD) Bilirrubina directa Acido clorhídrico 150 mmol/L
- Reactivo 2** Acido sulfanílico 30 mmol/L
(BT) Bilirrubina total Acido clorhídrico 50 mmol/L
Dimetilsulfóxido 7 mol/L
(DMSO)
- Reactivo 3** Nitrito de sodio 29 mmol/L

PREPARACION Y ESTABILIDAD

Todos los reactivos están listos para su uso.

Son estables hasta su fecha de caducidad indicada en el envase.

5. PROCEDIMIENTO

5.1 TÉCNICA

Longitud de onda BT Total 546 nm
BD Directa 578 nm
Temperatura 25/30/37°C
Cubeta 1 cm paso de luz
Lectura frente a aire o agua destilada
Blanco

| | Total | Directa |
|-----------------------------|--------|---------|
| R.1 Bilirrub. directa -- -- | 1.5 mL | 1.5 mL |
| R.2 Bilirrub. total | 1.5 mL | 1.5 mL |
| R.3 Nitrito sódico -- | 50 µL | 50 µL |
| Muestra | 100 µL | 100 µL |

Mezclar y esperar 5 min exactamente a temperatura ambiente.
Leer las densidades ópticas.

6. RESULTADOS

6.1 Cálculo (Total o Directa)

Con calibrador
$$\frac{\text{Abs muestra} - \text{Abs blanco muestra}}{\text{Abs calibrador} - \text{Abs blanco calibrador}} \times \text{conc. Calibrador} = \text{mg/dL de bilirrubina}$$

Con factor
$$\text{Abs muestra} - \text{Abs (blanco muestra)} \times \text{factor}^* = \text{mg / dL de bilirrubina en la muestra}$$

*Factor:
$$\frac{\text{Concentración del calibrador}}{\text{Abs calibrador} - \text{Abs blanco calibrador}}$$

Factor teórico: Bilirrubina (T) = 19.1; Bilirrubina (D) = 14
Factor de conversión: mg/dL x 17.1 = µmol / L.

6.2 Linealidad

Este método es lineal hasta valores de 20 mg/dL
Para valores superiores diluir la muestra 1:2 con solución salina y repetir la determinación multiplicando el resultado por 2.

6.3 Límites de Seguridad Biológica

Bilirrubina total: hasta 1.0 mg/dL (17.1 µmol/L)
Bilirrubina directa: hasta 0.3 mg/dL (5.1 µmol/L)
Recién nacido:
Bilirrubina total: mayor 5.8 mg/dL (<100 µmol/L)

CONTROL DE CALIDAD

SPINTROL. Normal y Patológico.

5.2 ALBÚMINA MÉTODO COLORIMÉTRICO “VERDE DE BROMOCRESOL”

1. INTRODUCCIÓN

La albúmina es una proteína globular que puede ser definida por cinco características: 1) es soluble en sulfato de amonio 2.03 mol/L a 23°C y a pH superior a 6, cuando es dializada contra agua destilada; 2) la migración de la proteína en un campo electroforético es -6.0 unidades de movilidad de Tiselius buffer de barbital en el cual una unidad de movilidad es $10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{seg}^{-1}$; 3) el peso molecular es aproximadamente 66,000 daltons y sedimenta a una velocidad de 4.5 S; 4) no posee carbohidratos y 5) la albúmina es el componentes principal del suero humano normal. La albúmina humana ha sido aislada y purificada hasta el punto de poder determinar su secuencia. Está formada por 584 aminoácidos y el peso molecular calculado para esta secuencia es 66,248 daltons. La proteína tiene diversas funciones; desempeña un papel importante en el mantenimiento de la presión osmótica coloide de la sangre, en el transporte de varios iones, ácidos y hormonas y en la nutrición. Los valores bajos de albúmina pueden explicar la toxicidad de algunos fármacos en niveles “bajos” cuando sólo se mide la concentración total de éstos en suero. En los sueros hipoalbuminémicos, la forma libre (activa) de la droga puede ser mucho mayor que en los sueros con niveles normales de albúmina, debido a la gran diferencia en la capacidad de unión entre los dos tipos de sueros. La mayor cantidad de droga libre puede causar entonces, una respuesta tóxica.

En la desnutrición, los niveles plasmáticos de albúmina disminuyen mucho más que los de la gammaglobulina. Otras de las funciones importantes de la albúmina es el mantenimiento del 75% de la presión osmótica coloide del plasma. Las alteraciones de los niveles séricos de albúmina pueden tener origen en un gran número de secuelas patológicas y en consecuencia no son específicas, aunque sí resultan útiles para evaluar el estado del paciente.

La hiperalbuminemia usualmente es atribuible a deshidratación o hemoconcentración. La hipoalbuminemia en general se debe a 1) hemodilución, 2) síntesis inferior a la pérdida y 3) enfermedades que causan una gran pérdida de albúmina.

La hemodilución puede ser causada por el desequilibrio de electrolitos. La menor síntesis puede ser atribuida a la incapacidad para obtener nutrientes debido a una desnutrición, malabsorción o a una incapacidad del hígado para la síntesis de albúmina ocasionadas por enfermedades como hepatitis crónica o aguda. Con frecuencia los niveles bajos de albúmina son debidos a grandes pérdidas como en el caso de síndrome nefrótico, enteropatía con pérdida proteica o lesiones

cutáneas exudativas. Si grandes áreas de la superficie cutánea están destruidas se producen severas pérdidas por ellas. El esfuerzo físico, hipertensión, infección del tracto urinario y la enfermedad cardíaca congestiva puede también aumentar la excreción urinaria de albúmina.

Los métodos de fijación de colorantes son los más usados para la determinación de albúmina sérica. La albúmina tiene la propiedad de fijarse a una amplia variedad de aniones orgánicos, incluyendo moléculas complejas de colorantes. Las técnicas de fijación de colorantes, se basan en un desplazamiento del máximo de absorción del colorante cuando está unido a la albúmina. Este desplazamiento permite que el color resultante sea medido en presencia de un exceso de colorante, lo cual junto con la alta afinidad de fijación con la albúmina permite que todas las moléculas de esta proteína tomen parte de la reacción. Se ha empleado una gran variedad de colorantes incluyendo naranja de metilo, ácido 2-(4'-hidroxiazobenceno)benzoico, verde de bromocresol y púrpura de bromocresol. La reacción con verde de bromocresol se lleva a cabo usualmente a pH 4.2-4.5 y se mide a 620 – 630 nm. La Asociación Americana de Química Clínica recomendó un método con verde de bromocresol. En este procedimiento la absorbancia del verde de bromocresol unido a la albúmina se mide a 628 nm en un buffer de succinato. La púrpura de bromocresol reacciona con la albúmina a pH 5.2 y su desplazamiento de color se mide a 603 nm.

Existen también refractómetros clínicos que cuentan con escalas graduadas para medir la concentración de proteínas totales.

2. OBJETIVOS

- ✓ Demostrar el manejo adecuado de la técnica para la determinación de albúmina en una muestra biológica.
- ✓ Establecer los valores de referencia de la albúmina y comparar con el valor de nuestra muestra problema a analizar.
- ✓ Definir cuales son las principales patologías que se presentan si tenemos valores altos o bajos de albúmina en una muestra biológica

3. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Prueba colorimétrica en la que la albúmina se combina con el verde de bromocresol a determinado pH produciéndose un cambio de color del indicador, de amarillo verdoso a verde azulado.

4. PREPARACIÓN

4.1 MUESTRA CLÍNICA

Suero o plasma

4.2 MATERIAL Y REACTIVOS

Material necesario

- 5 tubos de ensayo de 13 X100mm.
- 1 Micropipeta de 1.0 mL.

1 Micropipeta de 10µL.
Puntas para micropipeta.
Gradilla.

EQUIPO

Fotómetro con filtro de lectura de: 630 nm.
Centrífuga

CONTENIDO DEL EQUIPO

Reactivo Solución de Verde Bromocresol a pH 4.2
Estándar Albúmina 5.0 g/dL

PREPARACIÓN Y ESTABILIDAD

El reactivo está listo para su uso. Será estable hasta su fecha de caducidad.
Se recomienda protegerlo de la luz.

5. PROCEDIMIENTO

5.1 TÉCNICA

| | Blanco | Standard | Muestra |
|----------|--------|----------|---------|
| Standard | | 5 µL | |
| Muestra | | | 5 µL |
| Reactivo | 1.0 mL | 1.0 mL | 1.0 mL |

Mezclar y esperar 10 minutos a temperatura ambiente.
Ajustar el aparato a cero con el blanco y efectuar las lecturas de las densidades ópticas del estándar y muestra a 630 nm.
La coloración es estable durante 1 hora.

6. RESULTADOS

6.1 Cálculo

$$\text{Albúmina (g/dL)} = \frac{\text{Abs muestra}}{\text{Abs estándar}} \times \text{Conc. Estándar (g/dL)}$$

6.2 Linearidad

Hasta valores de 6.0 g/dL
Valores superiores se diluirán a la 1:2 con solución salina.

6.3 Límite de Seguridad Biológica

Suero: de 3.5 a 5.0 g/dL

CONTROL DE CALIDAD

SPINTRON. Normal y Patológico. Sueros control valorados.

5.3 PROTEÍNAS TOTALES MÉTODO COLORIMÉTRICO - "BIURET".

1. INTRODUCCIÓN

Proteínas séricas en la evaluación de la función hepática.

Para la síntesis de las proteínas séricas se requiere un hígado sano en plenas funciones, excepto en el caso de las gamma globulinas. El hígado tiene la capacidad de duplicar la producción y salida de proteínas durante las enfermedades asociadas con pérdida de proteínas. En consecuencia, no debe sorprender que las mediciones de proteínas totales no se alteren sino hasta que haya ocurrido una disminución extensiva de la función hepática.

La albúmina se disminuye en la enfermedad hepática crónica y generalmente se acompaña por un incremento en las globulinas beta y gamma, debido a la producción de IgG e IgM en la hepatitis crónica activa y de la IgM e IgA en la cirrosis biliar o alcohólica respectivamente. Se debe hacer énfasis en que estas inmunoglobulinas no son producidas en el hígado sino por las células plasmáticas del sistema reticuloendotelial. Se puede facilitar la identificación de estas subclases de gamma globulinas mediante la inmunoelectroforesis. Sin embargo, una disminución en la albúmina sérica no es específica para la enfermedad hepática, puesto que la albúmina también disminuye en la malabsorción, la desnutrición, la enfermedad renal, el alcoholismo y las enfermedades malignas.

La fracción alfa₁ de las globulinas séricas se disminuye en la enfermedad hepática crónica y cuando esta fracción está ausente, o casi, indica que una deficiencia en la alfa₁-antitripsina puede ser la causa de la enfermedad hepática. Las proteínas séricas, globulina alfa₂ y beta se aumentan en la ictericia obstructiva. Este incremento en la alfa₂-globulina y la beta globulina en la ictericia obstructiva está asociada con interferencias en el metabolismo normal de las lipoproteínas. Por consiguiente, no se puede hacer claramente el fenotipo de un desorden lipídico en presencia de enfermedad hepática. El uso del colesterol de alta densidad para evaluar el riesgo de la enfermedad coronaria se obvia en los pacientes con enfermedad hepática alcohólica, obstrucción biliar y necrosis hepática aguda.

El hígado produce los factores de coagulación y estos pueden disminuir significativamente en la presencia de enfermedad hepática. El fibrinógeno plasmático está presente normalmente en una concentración de 2 a 4 g/L. Una disminución en el fibrinógeno plasmático indica una enfermedad hepática severa y está asociada con concentraciones disminuidas de otros factores de coagulación, especialmente la protrombina. Puesto que la síntesis de la protrombina ocurre en el hígado, y requiere de la vitamina liposoluble K, se puede incrementar el tiempo de protrombina, en la enfermedad obstructiva biliar, la cirrosis o necrosis hepática, la falla hepática, el síndrome de Reye, los abscesos hepáticos, la deficiencia de vitamina K y la hepatitis. Se puede diferenciar la enfermedad intrahepática asociada con una disminución en el factor de coagulación, de la enfermedad obstructiva intrahepática con una absorción disminuida de vitamina K, observando la respuesta del tiempo de protrombina a la administración exógena de vitamina K.

2. OBJETIVOS

- ✓ Demostrar el manejo adecuado de la técnica para la determinación de proteínas en una muestra biológica.
- ✓ Establecer los valores de referencia de proteínas y comparar con el valor de nuestra muestra problema a analizar.
- ✓ Definir cuales son las principales patologías que se presentan si tenemos valores altos o bajos de proteínas.

3. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Los grupos -CO-NH- unidos entre sí dan una reacción con formación de color violeta con las sales cúpricas en medio alcalino, siendo la más representativa y simple la que da con el Biuret -NH₂-CO-NH-CO-NH₂. Es en la actualidad el método colorimétrico más exacto y simple para la determinación de proteínas totales.

4. PREPARACIÓN

4.1 MUESTRA CLINICA

Suero, plasma.

4.2 MATERIAL Y REACTIVOS

Material necesario

- 5 tubos de ensaye de 13 X100mm.
- 1 Micropipetas de 1.0 mL.
- 1 Micropipeta de 10 μ L.
- Puntas para micropipeta.
- Gradilla.

Fotómetro termostable a 37°C con filtro de 540 nm.

CONTENIDO DEL EQUIPO

| | | |
|-------------------|---------------------|------------|
| Reactivo 1 | Tartrato K-Na | 15 mmol/L |
| | Yoduro sódico | 100 mmol/L |
| | Yoduro de potasio | 5 mmol/L |
| | Sulfato de cobre II | 5 mmol/L |
| Standard | Sol. Proteínas | 7 g/dL |

ESTABILIDAD

A temperatura ambiente la estabilidad es hasta la fecha de caducidad indicada en el envase.

5. PROCEDIMIENTO

5.1 TECNICA

| | Blanco | Estándar | Muestra |
|------------|--------|----------|---------|
| Estándar | | 25 µL | |
| Muestra | | | 25 µL |
| R.1 Biuret | 1.0 mL | 1.0 mL | 1.0 mL |

Mezclar e incubar 15 min a 30-37°C. Dejar enfriar 5 minutos a temperatura ambiente. Leer, frente al blanco de reactivo, a 540 nm. Coloración estable 30 minutos.

6. RESULTADOS

6.1 Cálculo

$$\frac{\text{Abs muestra}}{\text{Abs estándar}} \times 7 (\text{Conc. Estándar}) = \text{g/L de proteínas totales}$$

$$1 \text{ g/ dL} = 10 \text{ g/L}$$

6.2 Linealidad

El método es lineal hasta valores de 15 g/dL (150 g/L)

6.3 Límite de Seguridad Biológica

Recién nacidos : 5.2 - 9.1 g/dL

Niños (hasta 3 años) : 5.4 - 8.7 g/dL

Adultos : 6.7 - 8.7 g/dL

CONTROL DE CALIDAD

SPINTROL. Normal y patológico.

5.4 ENZIMAS DE INTERÉS CLÍNICO

Las enzimas biológicas permiten que las reacciones metabólicas procedan con rapidez. Las enzimas con significado clínico funcionan en forma intracelular. Cuando se produce algún daño a los tejidos por enfermedades o lesiones, se liberan enzimas a la circulación y su actividad puede medirse como indicador de dichos daños.

La actividad enzimática varía de acuerdo con la ubicación celular. Por lo tanto, el patrón de elevación enzimática es útil para detectar y diferenciar diversas enfermedades. Además existen varias isoenzimas en las que se observa una leve diferencia estructural de la enzima que depende del tejido primario en el cual se sintetiza. Esta diferencia estructural permite separar las enzimas totales en todas sus formas isoenzimáticas. Por este motivo, en vez de la determinación de una sola enzima, las baterías de pruebas enzimáticas que constan del análisis de dos o más enzimas o isoenzimas en vez de la determinación de una sola enzima, ofrecen una mayor sensibilidad y especificidad diagnósticas para la detección de afecciones. La batería enzimática característica para diversas afecciones cardiacas están conformadas de análisis de CK, isoenzima CK, LDH, isoenzima LDH y AST. La isoenzima CK-MB y el patrón isoenzimático invertido de LDH proporcionan mayor información diagnóstica para detectar el infarto al miocardio. Las enzimas que se solicitan para el diagnóstico de afecciones hepáticas incluyen AST, ALT, GGT y ALP. De ellas la AST y la ALT se elevan más en afecciones hepatocelulares, mientras que la GGT y la ALP indican, con mayor frecuencia, afecciones hepato biliares. La batería de pruebas enzimáticas para afecciones pancreáticas están conformadas de análisis de AMS y LPS; la CK total y la CK-MN son los indicadores más específicos de afecciones musculares.

A medida que se cuente con tecnología más avanzada, los análisis enzimáticos ofrecerán una sensibilidad y especificidad diagnósticas aún mayores, con capacidad para distinguir y detectar mejor las isoenzimas y las isoformas de las mismas.

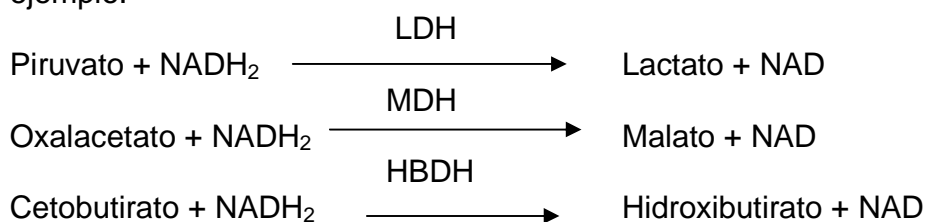
La importancia radica indudablemente en la selección adecuada de las metodologías más modernas, específicas y sensibles, para evaluar las enzimas presentes.

Para las determinaciones enzimáticas se pueden emplear fundamentalmente dos clases de métodos: directos e indirectos. En los primeros se mide la desaparición de los sustratos enzimáticos o la aparición de uno de los productos de la reacción, por ejemplo:



La actividad de la fosfatasa puede determinarse directamente dentro del rango de la luz visible ($\lambda = 405 \text{ nm}$) midiendo la intensidad del color del p-nitrofenol liberado por hidrólisis del p-nitrofenilfosfato, como resultado de la acción de la fosfatasa. En este caso, uno de los productos formados, (p-nitrofenol) por ser colorido permite medir directamente la actividad enzimática.

b) La desaparición de un compuesto no colorido, por transformarse en otro también incoloro. Este tipo de reacciones debe medirse a longitudes de onda específicas para el compuesto cuya desaparición se está controlando, por ejemplo:



en estas reacciones lo que se mide es la oxidación de la coenzima en su forma reducida (NADH₂), que absorbe específicamente a 340 nm. Por la acción de las deshidrogenasas anteriores, la coenzima pasa a su forma oxidada (NAD) que se absorbe a 340 nm sino a 260 nm (método UV).

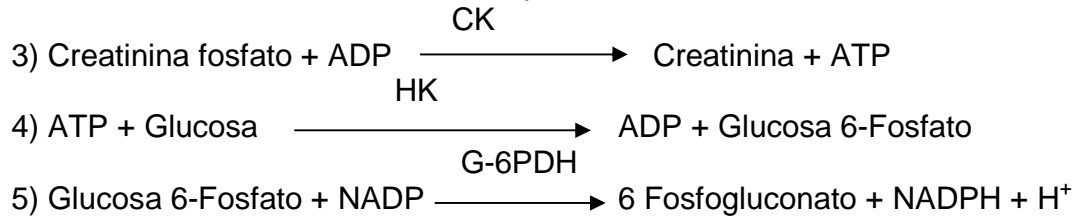
.En los métodos indirectos, como su nombre lo indica, la actividad de la enzima se determina sólo en forma indirecta. Para ello es necesario acoplar dos o más reacciones, en una de las cuales intervenga la enzima que se desea determinar. Esta cataliza generalmente la transformación de un sustrato a un metabolito intermedio (producto de la reacción), cuya concentración se determina por la acción de una segunda enzima, de la cual ese metabolito es sustrato. La segunda enzima llamada enzima auxiliar, debe adicionarse generalmente durante la determinación, en tal forma que al final de la reacción lo que se mide es el resultado del acoplamiento de dos reacciones enzimáticas.

Como ejemplo de este tipo de determinaciones por métodos indirectos podemos mencionar las determinaciones de ALT, AST y CK, por métodos (UV). A diferencia de los métodos colorimétricos directos, como en el caso de la ALT, no se determina el piruvato formado, sino que éste se emplea a su vez como sustrato de una enzima auxiliar (LDH), que como se indicó debe adicionarse en la reacción:



En este caso se han acoplado las reacciones 1 y 2 midiendo la transformación de NADH y H⁺ a NAD, que como puede verse sólo está relacionada indirectamente con la enzima ALT.

En el caso de la creatinina fosfocinasa (CPK) o creatinina cinasa (CK) como también se le denomina, no solo se acoplan dos reacciones sino tres:



Para medir la actividad de la enzima que cataliza la fosforilación del ADP en ATP, es decir creatinina cinasa, es necesario emplear el ATP resultante, como donador de grupos fosfato que requiere la hexocinasa (HK) para formar glucosa 6-fosfato. Este compuesto tiene que ser empleado todavía en una tercera reacción como sustrato de otra enzima auxiliar, la deshidrogenasa de glucosa 6-fosfato (G-6FDH). Esta segunda enzima auxiliar es la que a su vez reduce la coenzima NADP (en su forma oxidada) hasta NADPH₂ y es la que puede ser medida a una longitud de onda a 340 nm.

Fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1). ALP

La fosfatasa alcalina realmente es un grupo de enzimas que hidrolizan los ésteres de monofosfatos a un pH alcalino. El pH óptimo para estas enzimas es generalmente de aproximadamente 10. No se conocen los sustratos naturales para la fosfatasa alcalina. La enzima ha sido identificada en la mayoría de los tejidos corporales y se localiza generalmente en las membranas celulares. La actividad más alta de la fosfatasa alcalina se observa en el hígado, los huesos, el intestino, el riñón y la placenta, y se han identificado por lo menos 11 isoformas diferentes de la fosfatasa alcalina en el suero. Puesto que la fosfatasa alcalina contiene normalmente cantidades significativas de ácido siálico, la mayoría de estas formas múltiples de la enzima son el resultado de diferentes grados de sialación. Se sabe que la enzima producida por la placenta tiene una composición proteica diferente de las otras composiciones enzimáticas.

La medición de la fosfatasa alcalina sérica es útil para diferenciar la enfermedad hepatobiliar de la enfermedad osteogénica. La actividad de la fosfatasa alcalina aumenta mucho (10 veces) como resultado de una síntesis localizada en la membrana después de una obstrucción extrahepatobiliar tal como la colestasis o los cálculos biliares. La obstrucción biliar intrahepática también se ve acompañada por una elevación de la actividad de la fosfatasa alcalina sérica, pero el grado de incremento es mucho menor (2 a 3 veces). La enfermedad hepática que produce necrosis de las células del parénquima no eleva la fosfatasa alcalina sérica a menos que la enfermedad hepática esté asociada con daño a los canalículos o con estasis biliar.

Es muy complicada la interpretación de la medición de la fosfatasa alcalina sérica, debido a que la actividad de la enzima puede aumentar en ausencia de enfermedad hepática. Los desórdenes más comunes que producen una elevación

de la fosfatasa alcalina son las enfermedades óseas, como la enfermedad de Paget, el raquitismo y la osteomalacia. También se incrementa la actividad de la fosfatasa alcalina sérica durante la pubertad debido al crecimiento acelerado de los huesos y durante el tercer trimestre del embarazo debido a la liberación de la fosfatasa alcalina por la placenta.

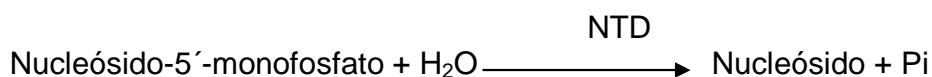
Gama-glutamyltransferasa (EC 2.3.2.2). GGT

La GGT (o γ GT) es una enzima localizada en la membrana que juega un papel importante en el metabolismo del glutatión y en la reabsorción de los aminoácidos del filtrado glomerular y de la luz intestinal. El glutatión (g-glutamylcisteinilglicina) en presencia de la GGT y un aminoácido o péptido transfiere el glutamato al aminoácido formando un enlace péptido en el ácido g- carboxílico, dando, por consiguiente, cisteinilglicina y el péptido g-glutamyl correspondiente.

Aunque la mayor actividad de la GGT se presenta en el tejido renal, la elevación de la GGT es generalmente el resultado de la enfermedad hepática. La GGT sérica se eleva antes que las otras enzimas hepáticas en enfermedades como la colecistitis aguda, la pancreatitis aguda, la necrosis hepática aguda y subaguda, y neoplasias de sitios múltiples que cursan con metástasis hepáticas. Puesto que la GGT es una enzima microsomal hepática, la ingestión crónica de alcohol o drogas como los barbitúricos, los antidepresivos tricíclicos y los anticonvulsivos inducen la producción de enzimas microsomales. Estas elevaciones inducidas por drogas preceden cualquier otro cambio en las enzimas del hígado, y si se suspende la ingestión de la droga en ese momento los cambios del hígado son generalmente reversibles. La GGT permite la diferenciación de las enfermedades hepáticas de otras condiciones en las cuales se eleva la fosfatasa alcalina sérica puesto que los niveles de GGT son normales en la enfermedad de Paget, el raquitismo y la osteomalacia y en los niños y mujeres embarazadas sin enfermedad hepática. Puesto que la próstata tiene una actividad significativa de GGT, la actividad sérica es mayor en hombres sanos que en mujeres. La mayor utilidad de la GGT está en el diagnóstico de colestasis causadas por la ingestión crónica de alcohol o drogas, colestasis mecánicas o virales, metástasis hepáticas, desórdenes óseos con elevaciones de la fosfatasa alcalina.

5'-Nucleotidasa (EC3.1.3.5).NTD

La 5'-Nucleotidasa (NTD) es una enzima localizada en los microsomas y las membranas celulares que cataliza la hidrólisis de los ésteres 5'-fosfato nucleósidos. La enzima sérica tiene un pH óptimo aparente de 7.5:

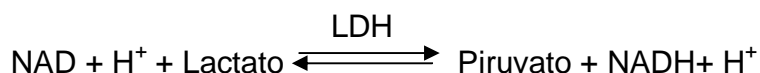


Al igual que la GGT, la NTD sérica se eleva en las enfermedades hepatobiliares tales como: obstrucción por cálculos del ducto biliar, colestasis biliar, cirrosis y enfermedad obstructiva causada por crecimiento neoplásico. Sin embargo, la NTD no se eleva generalmente en daño hepático inducido por drogas.ref Por esto es útil medir la NTD junto con la GGT para seguir el curso de la quimioterapia en neoplasias del hígado. Puesto que la NTD no se eleva en la enfermedad ósea, al

igual que la GGT es útil para diferenciar las causas hepáticas para la elevación en la fosfatasa alcalina, derivadas de otros factores, tales como las enfermedades óseas, el embarazo y crecimiento normal.

Deshidrogenasa láctica (EC 1.1.1.27). LDH

La deshidrogenasa láctica está presente en muchos tejidos. La LDH cataliza la interconversión de piruvato y lactato:



La mayor actividad de la LDH se presenta en el riñón y el corazón, y la menor en el pulmón y el suero. La LDH se localiza en el citoplasma celular y es por lo tanto liberada al suero, cuando las células se dañan o necrosan.

Cuando solamente está implicado un órgano específico, como el hígado, la medición de la LDH total puede ser útil. La LDH se incrementa en las hepatitis virales o tóxicas, en la obstrucción biliar extrahepática, en la necrosis aguda del hígado y en la cirrosis del hígado. Sin embargo, en condiciones en las que puedan estar implicadas varios órganos la medición del LDH total es menos útil que la medición de las isoenzimas de la LDH. Las isoenzimas LDH₅ y LDH₄ son las responsables de la actividad primaria del hígado, mientras que las isoenzimas LDH₁ y LDH₂ son las responsables por la actividad predominante de la LDH en el corazón y el riñón. Puesto que los glóbulos rojos también contienen mucha LDH₁, se debe evitar el análisis de muestras de suero bemozadas. En las condiciones hepáticas, la electroforesis de la LDH muestra que la elevación en la LDH total se debe a la liberación de LDH₄ y LDH₅ al suero.

Aspartato aminotransferasa (EC 2.6.1.1) y alanino aminotransferasa (EC 2.6.1.2).

Las transaminasas ASAT y ALAT catalizan la conversión de aspartato y alanina a oxaloacetato y piruvato respectivamente. En el hígado se encuentran los niveles más altos de ALAT, mientras que la ASAT se encuentra presente en el corazón, músculo esquelético e hígado en cantidades similares. La actividad en el suero tanto de la ASAT como de la ALAT aumentan rápidamente durante el comienzo de la ictericia viral y permanecen elevadas por 1 a 2 semanas. En las hepatitis tóxicas también se elevan la ALAT y la ASAT, pero la LDH se eleva mucho más, como resultado de la necrosis celular hepática. En los pacientes con hepatitis crónica activa también se observan aumentos en la ASAT y ALAT.

La necrosis hepática aguda se acompaña por incrementos significativos en las actividades de tanto la ALAT como de la ASAT. El aumento en la actividad de la ALAT es generalmente mayor que el incremento en la actividad de la ASAT. En la cirrosis del hígado, las actividades de las transaminasas séricas generalmente no se elevan por encima de 300 U/L, sin importar la causa de la enfermedad cirrótica. Las elevaciones de las ALAT y ASAT séricas observadas en el síndrome de Reye, son atribuibles directamente al daño hepático, y el incremento de la ALAT es generalmente mayor que el incremento en la ASAT. También se incrementan las transaminasas en la actividad neoplásica.

En el diagnóstico de la enfermedad del hígado, la medición de los niveles séricos de ASAT y ALAT es valiosa. Sin embargo, la mejor manera de usar estos análisis es junto con otros análisis de enzimas como la LDH y la creatina cinasa, y con otras mediciones de la función renal y hepática como la urea sanguínea, la creatinina, el amoníaco y la bilirrubina. Esto es importante cuando se establece el diagnóstico, puesto que la ALAT y la ASAT están presentes en otros tejidos además del hígado, y la actividad sérica de estas enzimas puede reflejar una enfermedad orgánica en tejidos distintos al hígado. Las actividades séricas de la ALAT y la ASAT se elevan en el infarto del miocardio, infarto renal, distrofia muscular progresiva y otro gran número de enfermedades que solamente afectan al hígado de una manera secundaria, como la enfermedad de Gaucher, la enfermedad de Niemann-Pick, la mononucleosis infecciosa, la leucemia mielocítica, la cetoacidosis diabética y el hipertiroidismo.

Otros compuestos analizados para hígado

Bilirrubina

El análisis de la bilirrubina sérica es útil para diferenciar la causa de la ictericia. La ictericia prehepática es el resultado de un incremento grande de la bilirrubina no conjugada debido a la liberación y el metabolismo aumentado de la hemoglobina después de la hemólisis. Se observa un incremento nulo o moderado en la bilirrubina conjugada debido a que el transporte de la bilirrubina al hígado y la formación del conjugado con el glucorónido limitan el proceso. Adicionalmente, debido a los niveles de bilirrubina conjugada que son excretados por el hígado, se elevan las concentraciones de urobilinógeno urinario y urobilina fecal, pero la bilirrubina urinaria (la cual es únicamente la forma conjugada libremente soluble) está ausente. En contraste la ictericia posthepática obstructiva se caracteriza por grandes aumentos en la bilirrubina conjugada sérica. La bilirrubina delta, bilirrubina unida covalentemente a la albúmina, también se eleva en este desorden. La medición de la bilirrubina delta, como prueba diagnóstica no ha logrado una aceptación generalizada. La acumulación de la bilirrubina en el suero se produce como consecuencia de una excreción biliar disminuida después de la conjugación de la bilirrubina, más que por una carga aumentada de bilirrubina causada por hemólisis. La excreción hepática de los metabolitos de la bilirrubina es baja y se puede evidenciar usualmente la bilirrubina urinaria. La ictericia hepática presenta un patrón intermedio en el cual las bilirrubinas séricas conjugadas y no conjugadas se incrementan al mismo grado con presencia de bilirrubina conjugada en la orina. Sin embargo, la concentración fecal de urobilina está disminuida.

Colesterol.

El colesterol sérico está compuesto de: colesterol libre y el esterificado. Puesto que la esterificación se realiza en el hígado la enfermedad intrahepática o la obstrucción biliar se caracterizan por un incremento del colesterol libre y ocasionalmente por un desplazamiento en el perfil de ácidos grasos libres del suero, aunque el colesterol total permanece usualmente sin modificar. El

colesterol total puede disminuir hasta valores inferiores al rango de referencia en la enfermedad crónica asociada con la destrucción del parénquima celular.

Ácidos biliares.

En la enfermedad se altera la secreción y producción de ácidos biliares. El suero contiene 1 a 2 mg/mL de ácidos biliares en el adulto sano. En la enfermedad hepatobiliar, las concentraciones de ácidos biliares séricos se pueden elevar hasta 1000 veces. También se pueden elevar significativamente en otras enfermedades como hepatitis, cirrosis, enfermedad hepática inducida por drogas y el hepatoma. Las concentraciones de ácidos biliares séricos se encuentran normales en la enfermedad de Gilbert, la hemocromatosis y la enfermedad poliquística del hígado. La medición de los ácidos biliares es útil para el diagnóstico de la disfunción hepática mínima cuando los otros parámetros aun están sin modificar.

Triglicéridos.

Los triglicéridos séricos se deben medir en una muestra en ayunas. Los incrementos son relativamente inespecíficos; la disfunción hepática causada por hepatitis, obstrucción biliar extrahepática y cirrosis se asocia con un incremento en los triglicéridos séricos, pero así sucede también en enfermedades como la pancreatitis aguda, infarto del miocardio, falla renal, gota, anemia perniciosa y diabetes mellitus. Los ácidos grasos libres también son no específicos. Están disminuidos en la hepatitis crónica, la falla renal crónica y la fibrosis quística. Las concentraciones de ácidos grasos libres se elevan en el síndrome de Reye, la encefalopatía hepática y la hepatitis crónica activa, pero también en el infarto del miocardio, la falla renal aguda, el hipertiroidismo y el feocromocitoma.

Proteínas séricas en la evaluación de la función hepática.

Se requiere un hígado sano en pleno funcionamiento para la síntesis de las proteínas séricas, excepto las gamma globulinas. El hígado tiene la capacidad de duplicar la producción y salida de proteínas durante las enfermedades asociadas con pérdida de proteínas. En consecuencia, no debe sorprender que las mediciones de proteínas totales no se alteren, sino hasta que haya ocurrido una disminución extensiva de la función hepática.

La albúmina se disminuye en la enfermedad hepática crónica y generalmente se acompaña por un incremento en las globulinas beta y gamma, debido a la producción de IgG e IgM en la hepatitis crónica activa y de la IgM e IgA en la cirrosis biliar o alcohólica respectivamente. Se debe hacer énfasis en que estas inmunoglobulinas no son producidas en el hígado, sino por las células plasmáticas del sistema reticuloendotelial. Se puede facilitar la identificación de estas subclases de gamma globulinas mediante la inmunoelectroforesis. Sin embargo, una disminución en la albúmina sérica no es específica para la enfermedad hepática puesto que la albúmina también disminuye en la malabsorción, la desnutrición, la enfermedad renal, el alcoholismo y las enfermedades malignas.

La fracción alfa1 de las globulinas séricas se disminuye en la enfermedad hepática crónica y cuando esta fracción está ausente, o casi, indica que una deficiencia en la alfa1-antitripsina puede ser la causa de la enfermedad hepática. Las proteínas séricas, globulina alfa2 y beta se aumentan en la ictericia obstructiva. Este incremento en la alfa2-globulina y la beta globulina en la ictericia obstructiva está asociada con interferencias en el metabolismo normal de las lipoproteínas. Por consiguiente, no se puede hacer claramente el fenotipo de un desorden lipídico en presencia de enfermedad hepática. El uso del colesterol de alta densidad para evaluar el riesgo de la enfermedad coronaria se obvia en los pacientes con enfermedad hepática alcohólica, obstrucción biliar y necrosis hepática aguda.

El hígado produce los factores de coagulación y éstos pueden disminuir significativamente en la presencia de enfermedad hepática. El fibrinógeno plasmático está presente normalmente en una concentración de 2 a 4 g/L. Una disminución en el fibrinógeno plasmático indica una enfermedad hepática severa y está asociada con concentraciones disminuidas de otros factores de coagulación, especialmente la protrombina. Puesto que la síntesis de la protrombina ocurre en el hígado, y requiere de la vitamina liposoluble K, se puede incrementar el tiempo de protrombina, en la enfermedad obstructiva biliar, la cirrosis o necrosis hepática, la falla hepática, el síndrome de Reye, los abscesos hepáticos, la deficiencia de vitamina K y la hepatitis. Se puede diferenciar la enfermedad intrahepática asociada con una disminución en el factor de coagulación, de la enfermedad obstructiva intrahepática con una absorción disminuida de vitamina K, observando la respuesta del tiempo de protrombina a la administración exógena de vitamina K.

Urea y amoníaco en la evaluación de la función hepática.

La concentración sanguínea de amoniaco es superior en los infantes que en los adultos, debido a que el desarrollo de la circulación hepática se termina después del nacimiento. La hiperamonemia es una entidad que resulta poco frecuente debido a defectos congénitos en el ciclo de la urea. El error innato del metabolismo más común es la deficiencia en ornitina transcarbamilasa. La hiperalimentación es una causa mucho más frecuente de hiperamonemia en infantes. Con frecuencia, se diagnostica el síndrome de Reye por un amoniaco sanguíneo elevado en ausencia de otra causa demostrable.

Los pacientes adultos muestran concentraciones elevadas de amoniaco sanguíneo en las etapas terminales de la cirrosis hepática, la falla hepática, y la necrosis del hígado aguda y subaguda. Se presagia el comienzo de la encefalopatía hepática por una elevación en el amoniaco sanguíneo. Se ha demostrado que la medición en líquido cefalorraquídeo (LCR) de la glutamina, correlaciona bien con el desarrollo de la encefalopatía hepática. También se puede usar la medición de la glutamina en el LCR, para diferenciar la encefalopatía hepática de la séptica. Sin embargo, no es común la medición de la glutamina en el LCR. La excreción de amoniaco urinario se eleva en la acidosis y se disminuye en la alcalosis, puesto que la formación de sales de amonio es un mecanismo importante para excretar el exceso de iones hidrógeno. Daños en los túbulos renales distales, tal como ocurre en la falla renal, la glomerulonefritis, el hipercorticoidismo y la enfermedad de Addison, conllevan a una excreción de

amoníaco disminuida sin presentar cambios en los niveles sanguíneos de amoníaco.

Puesto que la urea se sintetiza en el hígado, se presenta nitrógeno ureico sérico bajo, en la enfermedad hepática sin daño en la función renal, aunque la relación urea a creatinina se puede conservar normal. La elevación en el nitrógeno ureico sérico no implica necesariamente daño renal, puesto que la deshidratación puede llevar a concentraciones de nitrógeno ureico tan altas como 600 mg/L, y los infantes que reciben una fórmula alta en proteínas pueden tener niveles de nitrógeno ureico de 250 a 300 mg/L. Naturalmente, enfermedades como la glomerulonefritis aguda, la nefritis crónica, el riñón poliquístico y la necrosis renal elevan el nitrógeno ureico.

5.5 FOSFATASA ALCALINA METODO CINÉTICO OPTIMIZADO.

1. INTRODUCCIÓN

La fosfatasa alcalina se encuentra ampliamente distribuida en los del cuerpo humano. Su fuente de importancia clínica incluye hígado, hueso, placenta, intestino, bazo y riñón. Aunque se desconoce su función biológica precisa, aparentemente participa en el transporte de membrana, ya que está unida a la membrana celular. En el hígado, la actividad de la ALP se localiza en la membrana celular que une el borde sinoidal de las células del páncreo a los canaliculos biliares. En los huesos la actividad de la ALP se localiza en la membrana celular que une el borde sinoidal de las células del páncreo a los canaliculos. En los huesos, su actividad se confina a los osteoblastos.

El aumento de actividad de fosfatasa alcalina en suero se observa en diversas afecciones; sin embargo, su significado clínico se relaciona principalmente con la detección de enfermedades óseas y hepáticas. La actividad de la ALP es útil para el diagnóstico diferencial de enfermedades hepáticas. La fosfatasa alcalina suele elevarse más en caso de afecciones de los conductos biliares, que en las que se produce principalmente la lesión hepatocelular. Por lo tanto en la enfermedad hepática coléstatica u obstrucción hepatobiliar, la ALP suele incrementarse hasta 10 o 15 veces más que los valores normales, pero en general sólo se observan leves elevaciones de 2 a 3 veces los valores normales en afecciones hepatocelulares como hepatitis. Además, la síntesis de esta enzima se estimula por la colestasis.

Otras afecciones hepáticas que también incrementan la actividad de la fosfatasa alcalina son: la mononucleosis infecciosa, la colangiolitias, la cirrosis total, carcinoma hepatocelular primario y carcinoma hepático metastático secundario, también incrementan la actividad de la fosfatasa alcalina.

La ALP también se sintetiza en las células osteoblásticas, en donde se produce la formación de hueso. Por tanto, en afecciones óseas con incremento de actividad osteoblástica, en general los niveles de fosfatasa alcalina se elevan.

Suero, plasma heparinizado.

La actividad del enzima debe ser determinada rápidamente o bien separar el suero de los hematíes.

La pérdida de la actividad enzimática es menor de un 10% entre 2 a 3 días a 15-25°C o durante 1 mes a -20°C.

4.3 MATERIAL Y REACTIVOS

Material necesario

5 tubos de ensayo de 13 X100mm.

1 Micropipetas de 1.0 mL.

1 Micropipeta de 50µL.

Puntas para micropipeta.

Gradilla

Equipo

Fotómetro termostable a 37°C con filtro de 405 nm.

Centrífuga

CONTENIDO DEL EQUIPO

Reactivo 1 Tampón dietanolamina (DEA) pH 10,4 1 mmol/L

Tampón Cloruro de magnesio 0.5 mmol/L

Reactivo 2 p-nitrofenilfosfato pNPP) 10 mmol/L

Comprimidos/polvo

5. PROCEDIMIENTO

5.1 TECNICA

Longitud de onda 405 nm

Temperatura 25/30/37°C

Cubeta 1 cm paso de luz

Lectura frente aire o agua destilada

| | Macro-test | Semimicro-test |
|-----------------|------------|----------------|
| Reactivo al uso | 3.0 mL | 1.2 mL |
| Muestra | 50 µL | 20 µL |

Mezclar y anotar la extinción. Poner en marcha el cronómetro.

Repetir la lectura a 1, 2 y 3 minutos.

Calcular el valor medio = $\Delta E/\text{min}$

6. RESULTADOS

Cálculo

$\Delta E/\text{min} \times 3300 = \text{U/L}$

Linealidad

Si el $\Delta E/\text{min}$, es superior a 0.250 se repetirá la determinación diluyendo la muestra a 1:10 con solución salina 0.9%.

Límite de Seguridad Biológica

25°C / 30°C / 37°C

Niños < 400 U/L < 480 U/L < 645 U/L

Adultos 60-170 U/L 73-207 U/L 98-279 U/L

Factores de conversión de temperaturas

| Temp. | Temperatura deseada | | |
|----------|---------------------|------|------|
| Reacción | 25°C | 30°C | 37°C |
| 25°C | 1.00 | 1.22 | 1.64 |
| 30°C | 0.82 | 1.00 | 1.33 |
| 37°C | 0.61 | 0.75 | 1.00 |

CONTROL DE CALIDAD

SPINTROL. Normal y patológico.

5.6 GAMMA GLUTAMIL TRANSFERASA γ -GT MÉTODO CINÉTICO. SUSTRATO CARBOXILADO.

1. INTRODUCCIÓN

La GGT (o γ -GT) es una enzima localizada en la membrana que juega un papel importante en el metabolismo del glutatión y en la reabsorción de los aminoácidos del filtrado glomerular y de la luz intestinal. El glutatión (γ -glutamilcisteinilglicina) en presencia de la GGT y un aminoácido o péptido transfiere el glutamato al aminoácido formando un enlace péptido en el ácido γ - carboxílico, formando, por consiguiente, cisteinilglicina y el péptido γ -glutamil correspondiente.

Aunque la mayor actividad de la GGT se presenta en el tejido renal, la elevación de la GGT generalmente es un indicador de la enfermedad hepática. La GGT sérica se eleva antes que las otras enzimas hepáticas en enfermedades como la colecistitis aguda, la pancreatitis aguda, la necrosis hepática aguda y subaguda, y neoplasias de sitios múltiples que cursan con metástasis hepáticas. Puesto que la GGT es una enzima microsomal hepática, la ingestión crónica de alcohol o drogas como los barbitúricos, los antidepresivos tricíclicos y los anticonvulsivantes inducen la producción de enzimas microsomales. Estas elevaciones inducidas por drogas preceden cualquier otro cambio en las enzimas del hígado y si se suspende la ingestión de la droga en ese momento, los cambios del hígado son generalmente reversibles. La GGT permite la diferenciación de otras enfermedades hepáticas en las cuales por sus condiciones se eleva la fosfatasa alcalina sérica, puesto que los niveles de GGT son normales en la enfermedad de

Paget, el raquitismo y la osteomalacia y en los niños y mujeres embarazadas sin enfermedad hepática. Asimismo, puesto que la próstata tiene una actividad significativa de GGT, la actividad sérica es mayor en hombres sanos que en mujeres. La mayor utilidad de la GGT está en el diagnóstico de colestasis causadas por la ingestión crónica de alcohol o drogas, colestasis mecánicas o virales, metástasis hepáticas, desórdenes óseos con elevaciones de la fosfatasa alcalina, pero en los que la GGT es normal y desórdenes de músculo esquelético en los cuales la transaminasa ASAT está elevada pero la GGT está normal.

2. OBJETIVOS

- ✓ Demostrar el manejo adecuado de la técnica para la determinación de la gama glutamiltransferasa en una muestra biológica.
- ✓ Establecer los valores de referencia de la enzima GGT y comparar con el valor de nuestra muestra problema a analizar.
- ✓ Definir cuales son las principales patologías que se presentan si tenemos valores altos o bajos de GGT en una muestra biológica.

3. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Se mide la actividad de la γ -glutamyl transferasa mediante un método cinético enzimático. En la reacción, la γ -glutamyl transferasa cataliza la transferencia de un grupo gamma-glutamyl desde el sustrato incoloro gamma-glutamyl-p-nitroanilina, al aceptor, glicilglicina, y genera un producto coloreado, la p-nitroanilina.

ESQUEMA DE LA REACCION QUIMICA



S015223L.EPS

4. PREPARACIÓN

4.1 MUESTRA CLINICA

Solamente utilizar suero. No utilizar plasma.

La γ -GT es estable en el suero 8 horas a 15-25°C, 3 días a 2-8°C y un mes congelado a -20°C.

4 MATERIAL Y REACTIVOS

Material necesario

- 5 tubos de ensayo de 13 X100mm.
- 1 Micropipetas de 1.0 mL.
- 1 Micropipeta de 200 μ L.
- Puntas para micropipeta.
- Gradilla

Equipo

Fotómetro termostable a 37°C con filtro de 405 nm.
Centrífuga

CONTENIDO DEL EQUIPO

Reactivo 1 Sol. Tampón TRIS pH 8.25 100 mmol/L

Reactivo 2 Glicilglicina 100 mmol/L
Comprimidos/ L-γ-glutamyl-3-carboxi-
Polvo p-nitroanilida 3 mmol/L

La estabilidad del monoreactivo es de 21 días a 2-8°C o 5 días a temperatura ambiente.

5. PROCEDIMIENTO 5.1 TÉCNICA

Longitud de onda: 405 nm

Temperatura: 25/30/37°C

Cubeta: 1 cm. paso de luz.

Lectura: frente aire o agua destilada

| | Macro-test | Semimicro-test |
|-----------------|------------|----------------|
| Reactivo al uso | 2.0 mL | 1.0 mL |
| Suero | 200 µL | 100 µL |

Mezclar, esperar 1 minuto. Anotar la lectura y poner en marcha el cronómetro.

Repetir la lectura a 1, 2 y 3 minutos.

Calcular el valor medio de los incrementos de extinción por minuto. ($\Delta E/\text{min}$)

6. RESULTADOS

Cálculo

A 405 nm

$$\Delta E/\text{min} \times 1190 = (\text{U/L})$$

Linealidad

El método es lineal hasta actividades de 250 U/L. Para valores superiores, se diluirá la muestra a 1:10 con solución salina 0.9%.

Límite de Seguridad Biológica

| | 25°C | 30°C | 37°C |
|---------|----------|----------|-----------|
| Mujeres | 4-18 U/L | 5-25 U/L | 7-32 U/L |
| Hombres | 6-28 U/L | 8-38 U/L | 11-50 U/L |

Factores de conversión de temperaturas

| Temp. | Temperatura deseada | | |
|----------|---------------------|------|------|
| Reacción | 25°C | 30°C | 37°C |
| 25°C | 1.00 | 1.37 | 1.79 |
| 30°C | 0.73 | 1.00 | 1.30 |
| 37°C | 0.56 | 0.77 | 1.00 |

NOTAS

La hemólisis interfiere en el test.

CONTROL DE CALIDAD

SPINTROL. Normal y patológico.

5.7 ASPARTATO AMINOTRANSFERASA GOT (AST) MÉTODO CINÉTICO U.V.

1. INTRODUCCIÓN

Aspartato aminotransferasa y alanino aminotransferasa

Las transaminasas ASAT y ALAT catalizan la conversión de aspartato y alanina a oxaloacetato y piruvato respectivamente. En el hígado se encuentran los niveles más altos de ALAT, mientras que la ASAT se encuentra presente en el corazón, músculo esquelético e hígado en cantidades similares. La actividad en el suero de tanto la ASAT como la ALAT aumenta rápidamente durante el comienzo de la ictericia viral y permanece elevada por 1 a 2 semanas. En las hepatitis tóxicas también se elevan la ALAT y la ASAT, pero la LDH se eleva mucho más como resultado de la necrosis celular hepática. En los pacientes con hepatitis crónica activa también se observan aumentos en la ASAT y ALAT.

La necrosis hepática aguda se acompaña por incrementos significativos en las actividades tanto la ALAT y la ASAT. El aumento en la actividad de la ALAT es generalmente mayor que el incremento en la actividad de la ASAT. En la cirrosis del hígado las actividades de las transaminasas séricas generalmente no se elevan por encima de 300 U/L, sin importar la causa de la enfermedad cirrótica. Las elevaciones en las ALAT y ASAT séricas observadas en el síndrome de Reye, son atribuibles directamente al daño hepático, y el incremento en la ALAT es generalmente mayor que el incremento en la ASAT. También se incrementa la actividad de las transaminasas en la actividad neoplásica.

En el diagnóstico de la enfermedad del hígado, la medición de los niveles séricos de ASAT y ALAT es valiosa. Sin embargo, la mejor manera de usar estos análisis es junto con otros análisis de enzimas como la LDH y la creatina cinasa, y con otras mediciones de la función renal y hepática como la urea sanguínea, la creatinina, el amoníaco y la bilirrubina. Esto es importante cuando se establece el diagnóstico puesto que la ALAT y la ASAT están presentes en otros tejidos además del hígado y la actividad sérica de estas enzimas puede reflejar una enfermedad orgánica en tejidos distintos al hígado. Las actividades séricas de la ALAT y la ASAT se elevan en el infarto del miocardio, infarto renal, distrofia muscular progresiva y otro gran número de enfermedades que solamente afectan al hígado de una manera secundaria, como la enfermedad de Gaucher, la enfermedad de Niemann-Pick, la mononucleosis infecciosa, la leucemia mielocítica, la cetoacidosis diabética y el hipertiroidismo.

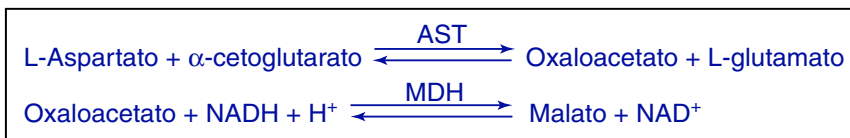
2. OBJETIVOS

- ✓ Aplicar el manejo adecuado de la técnica para la determinación de la aspartato aminotransferasa en una muestra biológica.
- ✓ Establecer los valores de referencia de la enzima AST y comparar con el valor de nuestra muestra problema a analizar.
- ✓ Definir cuales son las principales patologías que se presentan si tenemos valores altos o bajos de AST en una muestra biológica.

3. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Se mide la actividad de la aspartato aminotransferasa mediante un método cinético enzimático. En la reacción, la aspartato aminotransferasa cataliza la transaminación reversible de L-aspartato y α -cetoglutarato a oxaloacetato y L-glutamato. Luego, el oxaloacetato se reduce a malato en presencia de malato deshidrogenasa (MDH), con la oxidación concurrente de α dinucleótido de nicotinamida adenina reducida (NADH) a dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD).

ESQUEMA DE LA REACCION QUIMICA



S015186L.EPS

4. PREPARACION

4.1 MUESTRA CLINICA

Suero o plasma heparinizado.

4.2 MATERIAL Y REACTIVOS

Material necesario

5 tubos de ensaye de 13 X100mm.

1 Micropipetas de 1.0 mL.

1 Micropipeta de 200 μ L.

Puntas para micropipeta.
Gradilla

Equipo

Fotómetro termostable a 37°C con filtro de 340 nm.
centrífuga
Cronómetro

CONTENIDO DEL EQUIPO

Reactivo 1 Tampón TRIS pH 7.8, 80 mmol/L
Tampón L-Aspartato 200 mmol/L

Reactivo 2 NADH 0.18 mmol/L
Comprimido LDH 800 U/L
MDH 600 U/L
 α -cetoglutarato 12 mmol/L

PREPARACIÓN Y ESTABILIDAD

El monoreactivo es estable 72 horas a 18-25°C ó 21 días a 2-8°C.

5. PROCEDIMIENTO

5.1 TÉCNICA

Temperatura : 25/30/37°C
Longitud de onda : 340 nm Hg334 nm Hg 365 nm
Cubeta :1 cm paso de luz.
Lectura frente aire o agua destilada.

| | Macrotest | Semimicrotest |
|-----------------|-------------|---------------|
| Reactivo al uso | 2.0 mL | 1.0 mL |
| Muestra | 200 μ L | 100 μ L |

Mezclar, esperar 1 minuto. Anotar la lectura y poner en marcha el cronómetro.
Repetir la lectura a 1, 2 y 3 minutos.

Calcular el valor medio de los incrementos de extinción por minuto ($\Delta E/\text{min}$)

6. RESULTADOS

6.1 Cálculos

340 nm $\Delta E/\text{min}$ x **1750**= U/L
334 nm $\Delta E/\text{min}$ x **1790**= U/L
365 nm $\Delta E/\text{min}$ x **3240**= U/L

6.2 Linealidad

Si la $\Delta E/\text{min}$ a 340 nm ó 334 nm es superior a 0.150 ó bien

a 365 nm es superior a 0.080, la muestra deberá diluirse a 1:10 con solución salina 0.9%. Deberá tenerse en cuenta esta dilución al hacer el cálculo.

Límite de Seguridad Biológica

25°C / 30°C / 37°C

Hombres hasta 19 U/L 26 U/L 38 U/L

Mujeres hasta 16 U/L 22 U/L 31 U/L

Factores de conversión de temperaturas

| Temp. reacción | Temperatura deseada | | |
|----------------|---------------------|------|------|
| | 25°C | 30°C | 37°C |
| 25°C | 1.00 | 1.37 | 2.08 |
| 30°C | 0.73 | 1.00 | 1.54 |
| 37°C | 0.48 | 0.65 | 1.00 |

OBSERVACIONES

La hemólisis interfiere en la determinación .

CONTROL DE CALIDAD

SPINTROL Normal y Patológico.

5.8 ALANINA AMINOTRANSFERASA (GPT) ALT MÉTODO CINÉTICO U.V.

1. INTRODUCCIÓN

Los valores de alanina aminotransferasa se utilizan en el diagnóstico y tratamiento de ciertas enfermedades hepáticas (p. ej., hepatitis viral y cirrosis) y cardíacas.

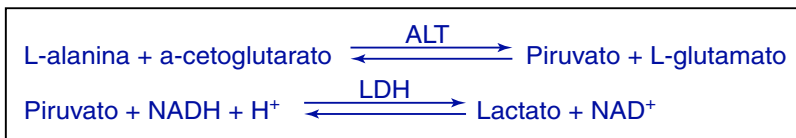
2. OBJETIVOS

- ✓ Aplicar el manejo adecuado de la técnica para la determinación de la alanina aminotransferasa en una muestra biológica
- ✓ Establecer los valores de referencia de la enzima ALT y comparar con el valor de nuestra muestra problema a analizar.
- ✓ Definir cuales son las principales patologías que se presentan si tenemos valores altos o bajos de alt en una muestra biológica

3. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Se mide la alanina aminotransferasa con un método cinético. En la reacción, la alanina aminotransferasa cataliza la transaminación reversible de un grupo amino de la L-alanina al α -cetoglutarato con formación de piruvato y L-glutamato. Luego, el piruvato se reduce a lactato en presencia de lactato deshidrogenasa (LDH) con la oxidación concurrente de alfa-dinucleótido de nicotinamida adenina reducido (NADH) a dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD).

ESQUEMA DE LA REACCION QUIMICA



S015177LEPS

La oxidación de NADH a NAD es directamente proporcional a la actividad de GPT.

4. PREPARACION

4.1 MUESTRA CLINICA

Suero o plasma heparinizado.

4.2 MATERIAL Y REACTIVO

Material necesario

- 5 tubos de ensaye de 13 X100mm.
- 1 Micropipetas de 1.0 mL.
- 1 Micropipeta de 200 μ L.
- Puntas para micropipeta.
- Gradilla

Equipo

- Fotómetro termostatable a 37°C con filtro de 340 nm.
- Cronómetro
- Centrífuga

CONTENIDO DEL EQUIPO

- Reactivo 1** Tampón TRIS pH 7.8, 100 mmol/L
Tampón L-Alanina 500 mmol/L
- Reactivo 2** NADH 0.18 mmol/L
Comprimidos LDH 1200 U/L
 α -cetoglutarato 15 mmol/L

5. PROCEDIMIENTO

5.1 TÉCNICA

Temperatura :..... 25/30/37°C
 Longitud de onda:.....340 nm Hg334 nm. Hg 365nm
 Cubeta :.....1 cm. paso de luz.
 Lectura frente aire o agua destilada.

| | | |
|-----------------|-----------|---------------|
| | Macrotest | Semimicrotest |
| Reactivo al uso | 2.0 mL | 1.0 mL |
| Muestra | 200 µL | 100 µL |

Mezclar, esperar 1 minuto. Anotar la lectura y poner en el cronómetro. Repetir la lectura a 1, 2 y 3 minutos.

Calcular el valor medio de los incrementos de extinción por minuto ($\Delta E/\text{min}$)

6. RESULTADOS

6.1 Cálculos

340 nm $\Delta E/\text{min}$ x **1750**= U/L

334 nm $\Delta E/\text{min}$ x **1790**= U/L

365 nm $\Delta E/\text{min}$ x **3240**= U/L

6.2 Linealidad

Si la $\Delta E/\text{min}$ a 340 nm ó 334 nm es superior a 0.150 ó bien a 365 nm es superior a 0.080, la muestra deberá diluirse en proporción de 1:10 con una solución salina 0.9%. Deberá tenerse en cuenta esta dilución al hacer el cálculo.

6.3 Límite de Seguridad Biológica

| | | | |
|---------------|--------|--------|--------|
| | 25°C | 30°C | 37°C |
| Hombres hasta | 22 U/L | 29 U/L | 40 U/L |
| Mujeres hasta | 18 U/L | 22 U/L | 32 U/L |

Factores de conversión de temperaturas

| | | | |
|----------|---------------------|------|------|
| Temp. | Temperatura deseada | | |
| Reacción | 25°C | 30°C | 37°C |
| 25°C | 1.00 | 1.32 | 1.82 |
| 30°C | 0.76 | 1.00 | 1.39 |
| 37°C | 0.55 | 0.72 | 1.00 |

OBSERVACIONES

La hemólisis interfiere en el test.

CONTROL DE CALIDAD

SPINTROL Normal y Patológico.

5.9 LACTATO DESHIDROGENASA LDH. MÉTODO CINÉTICO U.V

1. INTRODUCCIÓN

Cuando solamente está implicado un órgano específico, como el hígado, la medición de la LDH total puede ser útil. La LDH se incrementa con las hepatitis virales o tóxicas, en la obstrucción biliar extrahepática, en la necrosis aguda del hígado y en la cirrosis del hígado. Sin embargo, en condiciones en las que puedan estar implicados varios órganos, la medición de la LDH total es menos útil que la medición de las isoenzimas de la LDH. Las isoenzimas LDH₅ y LDH₄ son las responsables de la actividad primaria del hígado, mientras que las isoenzimas LDH₁ y LDH₂ son las responsables por la actividad predominante de la LDH en el corazón y el riñón. Puesto que los glóbulos rojos también contienen mucha LDH₁, se debe evitar el análisis de muestras de suero hemolizadas. En las condiciones hepáticas, la electroforesis de la LDH muestra que la elevación en la LDH total se debe a la liberación de LDH₄ y LDH₅ al suero.

La mayor actividad de la LDH se presenta en el riñón y el corazón, y la menor en el pulmón y el suero. La LDH se localiza en el citoplasma celular y es por tanto liberada al suero cuando las células se dañan o necrosan.

Los valores de lactato deshidrogenasa se utilizan en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades hepáticas tales como la hepatitis viral aguda, la cirrosis y el carcinoma hepático metastásico, también en enfermedades cardíacas como el infarto del miocardio, y tumores de pulmón o de riñón.

2. OBJETIVOS

- ✓ Aplicar el manejo adecuado de la técnica para la determinación de la lactato deshidrogenasa en una muestra biológica.
- ✓ Establecer los valores de referencia de la enzima LDH y comparar con el valor de nuestra muestra problema a analizar.
- ✓ Definir cuáles son las principales patologías que se presentan si tenemos valores altos o bajos de LDH en una muestra biológica.

3. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El reactivo LDH se utiliza para medir la actividad de la lactato deshidrogenasa con un método cinético enzimático. En la reacción, la LDH cataliza la oxidación reversible de L-lactato a piruvato con la reducción concurrente de dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD) a dinucleótido de nicotinamida adenina reducido (NADH).

La deshidrogenasa láctica está presente en muchos tejidos. La LDH cataliza la interconversión de piruvato y lactato:

ESQUEMA DE LA REACCION QUIMICA



S015239L.EPS

Sólo para uso en diagnóstico in vitro.

La oxidación de NADH a NAD⁺ acompañada por una disminución de absorbancia a 340 nm es directamente proporcional a la actividad de LDH.

4. PREPARACION

4.1 MUESTRA CLINICA

Suero.

4.2 MATERIAL Y REACTIVOS

Material necesario

- 5 tubos de ensayo de 13 X100mm.
- 1 Micropipetas de 1.0 mL.
- 1 Micropipeta de 50µL.
- Puntas para micropipeta.
- Gradilla

Equipo

- Pipetas de 2 mL y 200 µL
- Fotómetro termostatable a 37°C con filtro de 340 nm.
- Cronómetro

CONTENIDO DEL EQUIPO

Reactivo 1 Tris pH.7.5, 50 mmol/L
Tampón Piruvato 0.6 mmol/L

Reactivo 2
Comprimidos NADH 0.18 mmol/L

El reactivo de trabajo es estable 5 días a 2-8°C ó 24 horas a temperatura ambiente.

La muestra puede ser conservada 48 horas a 2-8° C.

5. PROCEDIMIENTO

5.1 TÉCNICA

Longitud de onda: . . . 340 nm o 334 ó 365 nm
Temperatura: 25/30/37°C
Cubeta: 1 cm paso de luz.

Lectura: frente aire o agua destilada

| | 25 °C | 30°C | 37°C |
|-----------------|--------|------|--------|
| Reactivo al uso | 3.0 mL | | 1.5 mL |
| Muestra | 100 µL | | 50 µL |

Mezclar y esperar 1 minuto.

Verter la mezcla en la cubeta, leer la extinción y poner en marcha el cronómetro.
Repetir la lectura a 1,2 y 3 minutos después.

Calcular ($\Delta E/\text{min}$)

6. RESULTADOS

6.1 Cálculo

A 25 y 30°C

340 nm ($\Delta E/\text{min}$) x **4925** = U/L

334 nm ($\Delta E/\text{min}$) x **5020** = U/L

365 nm ($\Delta E/\text{min}$) x **9120** = U/L

A 37°C

340 nm ($\Delta E/\text{min}$) x **9690** = U/L

334 nm ($\Delta E/\text{min}$) x **9880** = U/L

365 nm ($\Delta E/\text{min}$) x **17950** = U/L

6.2 Linealidad

Si el $\Delta E/\text{min}$ a 340 nm es superior a 0.150 ó bien si a 365 nm es superior a 0.080, repetir la prueba diluyendo la muestra a 1:10 con solución salina 0.9%.

6.3 Límite de Seguridad Biológica

| 25°C | 30°C | 37°C |
|-------------|-------------|-------------|
| 120-240 U/L | 160-320 U/L | 230-460 U/L |

Factores de conversión de temperaturas

| Temp. | Temperatura deseada | | |
|----------|---------------------|------|------|
| Reacción | 25°C | 30°C | 37°C |
| 25°C | 1.00 | 1.33 | 1.92 |
| 30°C | 0.75 | 1.00 | 1.43 |
| 37°C | 0.52 | 0.70 | 1.00 |

NOTAS

La hemólisis interfiere en test.

CONTROL DE CALIDAD

SPINTROL. Normal y patológico.

UNIDAD VI FUNCIÓN GÁSTRICA, PANCREÁTICA E INTESTINAL

6.1 AMILASA AMY PRUEBA CINÉTICA- CNPG3

1. INTRODUCCIÓN

El páncreas puede ser la “glándula maestra” del cuerpo si se consideran los graves trastornos digestivos y metabólicos que aparecen cuando se pierden sus funciones exocrinas y endocrinas. El principal trastorno al que conduce la pérdida de la función endocrina es la diabetes mellitus, que cuenta con mayor morbilidad y mortalidad que todas las otras enfermedades pancreáticas juntas. Las pruebas de laboratorio importantes a este respecto, son la determinación de glucosa en sangre, fructosamina y hemoglobina A1c con objeto de conocer el control glucémico a corto y largo plazo. La pérdida de la función exocrina es común en la fibrosis quística y en algunos sujetos con ataques repetidos de pancreatitis generalmente causados por el abuso crónico del alcohol. El páncreas tiene una gran reserva y la pérdida de la función produce síntomas sólo después de que 85% de las células acinares se ha perdido. Existen algunas pruebas de función pancreática que junto con la de grasa en materia fecal son las más importantes. Las pruebas en suero, como la tripsina inmunorreactiva, son las menos sensibles y menos específicas a pesar de ser las más fáciles de realizar.

La pancreatitis aguda es una de las principales emergencias médicas; el alcoholismo y las enfermedades del tracto biliar son las causas predominantes, aunque sólo tenemos algunas evidencias conjeturales de cómo se inicia una pancreatitis. Los cambios observados en las enzimas pancreáticas como amilasa y lipasa pueden ser de moderados a intensos, desafortunadamente sólo es posible obtener una estimación gruesa de la gravedad del padecimiento con los estudios de laboratorio. La pancreatitis crónica generalmente es la secuela de múltiples brotes de la enfermedad aguda y los resultados de laboratorio normalmente no son muy útiles para el diagnóstico. El adenocarcinoma de páncreas, la forma común de la enfermedad maligna, es funesta para casi todos los pacientes debido a la naturaleza invasiva del cáncer y su progresión rápida y silenciosa. No existen pruebas adecuadas de escrutinio para el cáncer pancreático y la muerte se presenta típicamente de seis meses a un año del diagnóstico. Las neoplasias de los islotes de Langerhans son un reto bioquímico para su diagnóstico. Excepto los gastrinomas que producen el síndrome de Zollinger-Ellison, la mayoría de estos tumores no son malignos pero pueden poner en peligro la vida debido a la liberación no controlada de factores endocrinos y la estimulación a sus órganos blancos. Para establecer el diagnóstico se requiere realizar pruebas que determinen las hormonas normalmente producidas en las células del islote de Langerhans y otros factores.

La amilasa alfa (AMS) es una metaloenzima que requiere calcio y pertenece a la clase de hidrolasas. La reacción enzimática que cataliza la amilasa alfa es la hidrólisis aleatoria de enlaces glicosídicos alfa-1,4 internos del almidón, glucógeno y otros polímeros de la glucosa. Los productos de digestión de la amilasa, que es una molécula de almidón lineal que contiene sólo enlaces alfa 1,4, son maltosa, maltotrinosa y otras dextrinas.

Las principales fuentes tisulares de esta enzima son las glándulas salivales y las células acinares del páncreas. La actividad de amilasa alfa no es específica para estos tejidos, ya que también se encuentra en el epitelio intestinal, trompas de Falopio, mucosa del cuello uterino, endometrio y tejido del seno durante la lactancia. La principal función de la amilasa alfa se debe a la fracción pancreática, que ayuda a la digestión del almidón, glucógeno y sus productos de descomposición en el intestino delgado. La AMS de la saliva inicia la digestión de almidón en la cavidad oral, pero su acción termina con rapidez a consecuencia del pH ácido del jugo gástrico durante la deglución.

Durante años los niveles de α -amilasa en suero nos han evidenciado la necesidad de su determinación para el diagnóstico de pancreatitis aguda. Las primeras técnicas estaban basadas en los cambios de la absorción máxima del complejo entre el almidón y el yodo, ya que la α -amilasa degrada al almidón. Otros métodos están basados en la producción de p-nitrofenol a partir de sustratos oligosacáridos específicos con grupos bloqueantes en el azúcar terminal. Estos métodos utilizan una variedad de enzimas para hidrolizar la corta cadena de oligosacáridos para producir p-nitrofenol.

Estas enzimas contienen una actividad residual de α -amilasa que reducen significativamente la estabilidad del reactivo. El método que presentamos no utiliza enzimas, evitando así este problema de estabilidad.

Se han desarrollado ensayos de apareamiento enzimático que permiten condiciones de hidrólisis más controladas y congruentes, y que también pueden adaptarse a instrumentos automatizados.

2. OBJETIVOS

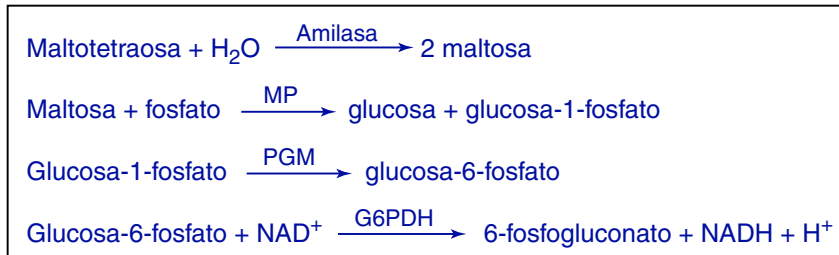
- ✓ Aplicar el manejo adecuado de la técnica para la determinación de la amilasa en una muestra biológica
- ✓ Establecer los valores de referencia de la enzima AMY y comparar con el valor de nuestra muestra problema a analizar.
- ✓ Definir cuáles son las principales patologías que se presentan si tenemos valores altos o bajos de AMY en una muestra biológica.

3. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Se mide la actividad de la amilasa con un método cinético enzimático. En la reacción, la amilasa cataliza la hidrólisis del sustrato definido (maltotetraosa) a maltosa. La velocidad de formación de maltosa se mide mediante el uso de tres reacciones relacionadas que catalizadas por la maltosa fosforilasa (MP), la

β -fosfoglucomutasa (PGM), y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), dan como resultado la producción de β -dinucleótido de nicotinamida adenina reducido (NADH) a partir de β -dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD).

ESQUEMA DE LA REACCIÓN QUÍMICA



S015182L.EPS

La cantidad de CNP formado puede ser detectado espectrofotométricamente a 405 nm dando una medida directa de la actividad de la α -amilasa de la muestra. La reacción no está inhibida por factores endógenos.

4. PREPARACION

4.1 MUESTRAS CLINICAS

Suero, plasma heparinizado u orina. Otros anticoagulantes como el citrato o EDTA no son recomendables. Una vez efectuada la extracción, centrifugar y separar el suero lo antes posible. La α -amilasa es estable en la muestra durante una semana a temperatura ambiente (20-25°C) y varios meses cuando la muestra se guarda bien tapada y refrigerada a 2-8°C.

4.2 MATERIAL Y REACTIVOS

Material necesario

- 5 tubos de ensaye de 13 X100mm.
- 1 Micropipeta de 1.0 mL.
- 1 Micropipeta de 20 μ L.
- 1 Micropipeta de 200 μ L.
- Puntas para micropipeta.
- Gradilla
- Pipeta de 2 mL

Equipo

- Fotómetro termostable a 37°C con filtro de 405 nm.
- Cronómetro

COMPOSICIÓN DEL REACTIVO

MES tampón pH 6.0, 100 mmol/L

2-Cl-4-Nitrofenil- α -D-maltotriosido (CNPG3) 2.25 mmol/L
Cloruro de sodio 350 mmol/L
Acetato de calcio 6 mmol/L
Tiocianato de potasio 900 mmol/L
Azida de Sodio 0.095%

PREPARACIÓN Y ESTABILIDAD

El reactivo está listo para su utilización.

Si el frasco no se ha abierto y se ha guardado a 2-8 °C, el reactivo será estable hasta la fecha de caducidad. Una vez abierto el reactivo será estable 60 días siempre y cuando se tape inmediatamente después de su uso diario y se guarde a 2-8°C.

5. PROCEDIMIENTO

5.1 TECNICA

Longitud de onda 405 nm
Temperatura 37°C
Cubeta 1 cm de paso de luz
Cero frente a agua destilada

| | |
|-------------------|------------|
| Reactivo | 1.0 mL |
| Muestra o control | 20 μ L |
| Orina | 10 μ L |

Mezclar y leer.

Medir el incremento de la absorbividad por minuto durante 1, 2 y 3 minutos $\Delta A/\text{min}$

6. RESULTADOS

6.1 CALCULO

Calcular la actividad de la α -amilasa de la muestra usando el siguiente factor:

Suero, plasma

Actividad (U/L)= $\Delta A/\text{min} \times 3954$

Orina

Actividad (U/L)= $\Delta A/\text{min} \times 7908$

Unidades SI: U/L X 0.01667= $\mu\text{kat/L}$

6.2 LINEALIDAD

Este método es lineal hasta 2000 U/L. Si la muestra es superior, debe diluirse la muestra con solución salina 1:2 y repetir el ensayo, multiplicando el resultado por 2.

6.3 Límite de Seguridad Biológica

Suero, plasma < 90 U/L

Orina <450 U/L

Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia dependiendo de la localización.

NOTAS:

Debido al contenido en α -amilasa de la saliva y el sudor, para reducir la posibilidad de contaminación, no pipetear el reactivo con la boca, ni tener en contacto la muestra y el reactivo con la piel. No se deben procesar muestras hemolizadas. Contiene tiocianato de potasio. Evitar su inhalación o contacto del reactivo con la piel y los ojos. Si ocurre lavar la piel y los ojos con abundante agua y consultar al médico.

CONTROL DE CALIDAD

SPINTROL. Normal y patológico.

6.2 LIPASA

1. INTRODUCCIÓN

La lipasa (LPS) es una enzima que pertenece a las hidrolasas, hidroliza los ésteres de glicerol de triglicéridos de ácidos grasos de cadena larga. La lipasa hidroliza preferencialmente los enlaces estéricos de los carbonos 1 y 3 de la molécula de triglicéridos y produce dos moléculas de ácido graso y una molécula de 2-monoglicérido.

Se observa actividad de lipasa en páncreas mucosa intestinal, estómago, leucocitos y tejido adiposo. Sin embargo, sólo la lipasa pancreática tiene significado clínico; su principal función consiste en hidrolizar los triglicéridos de la dieta que han sido emulsificados por ácidos biliares y ayudan así a la absorción de grasas en el intestino delgado.

Como la lipasa se produce principalmente las células acinares del páncreas, su utilidad clínica se relaciona casi de manera exclusiva con el diagnóstico de laboratorio de pancreatitis aguda. Otras afecciones en las cuales se incrementa la actividad de lipasa incluyen intoxicación aguda con alcohol y traumatismos accidentales o quirúrgicos del abdomen.

2. OBJETIVOS

- ✓ Aplicar el manejo adecuado de la técnica para la determinación de la lipasa en una muestra biológica.
- ✓ Establecer los valores de referencia de la enzima LPS y comparar con el valor de nuestra muestra problema a analizar.

- ✓ Definir cuales son las principales patologías que se presentan si tenemos valores altos o bajos de LPS en una muestra biológica

3. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

La lipasa pancreática en presencia de colipasa, desoxicolato, además de iones calcio, hidroliza el sustrato 1-2-O-dilauryl-rac-glycerol-3-glutárico ácido-(6' - metilresorufina)-éster, según la secuencia de las siguientes reacciones:
1-2-O-dilauryl-rac-glycerol-3-glutárico ácido-(6' -metilresorufina)-éster
>1-2-O-dilauryl-rac-glycerol + glutáricoácido-6'-metilresorufina
éster (no estable) > ácido glutárico + Metilresorufina

4. PREPARACION

4.1 MUESTRA CLINICA

Suero fresco no hemolizado o plasma.

4.2 MATERIAL Y REACTIVOS

Material necesario

- 5 tubos de ensaye de 13 X100mm.
- 1 Micropipeta de 1.0 mL.
- 1 Micropipeta de 10 μ L.
- Puntas para micropipeta.
- Gradilla

Equipo:

- Fotómetro termostable a 37°C con filtro de 580 nm.
- Cronómetro

CONTENIDO DEL EQUIPO

- Reactivo 1** Tampón TRIS pH: 8.4, 40 mmol/L
Colipasa 40 000 U/L
Desoxicolato 1.8 mmol/L

Estabilizante

- Reactivo 2** Tartrato pH: 4.0, 1.6 mmol/L
Sustrato 0.24 mmol/L
Cloruro de calcio 0.1 mmol/L
Detergente
Estándar Lipasa

PREPARACIÓN Y ESTABILIDAD

R.1 y R.2, ambos reactivos están listos para su uso. Agitar suavemente el R.2 antes de su uso. Estándar: reconstituir el vial con 1 mL de agua bidestilada. La estabilidad es de 10 días a 2-8 °C ó 3 meses congelado a -20°C. Se recomienda congelar alícuotas.

5. PROCEDIMIENTO

5.1 TECNICA

Longitud de onda: 580 nm
Temperatura: 37°C
Cubeta: 1 cm paso de luz

| | Blanco | Estándar | Muestra |
|----------------|--------|----------|---------|
| Agua destilada | 10 µL | | |
| Estándar | | 10 µL | |
| Muestra | | | 10 µL |
| R.1 | 1.0 mL | 1.0 mL | 1.0 mL |
| R.2 | 100 µL | 100 µL | 100 µL |

Mezclar e incubar 1 minuto a 37°C.

Efectuar una lectura inicial al primer minuto y repetir lecturas después de 1 y los 2 minutos siguientes.

Calcular el incremento de extinción ($\Delta E/\text{min}$) del blanco, estándar y muestra.

6. RESULTADOS

6.1 Cálculo

Restar a las lecturas ($\Delta E/\text{min}$) efectuadas del estándar y muestras, el incremento del blanco ($\Delta E/\text{min}$).

$\Delta E/\text{min}$ muestra x actividad estándar = U/L Lipasa

$\Delta E/\text{min}$ estándar

6.2 Linealidad

El método es lineal hasta actividades de: 250 U/L

6.3 Límite de Seguridad Biológica

U/L metilresorufin a 37°C : < 30 U/L

NOTAS:

La actividad de la lipasa en U/L metilresorufin a 37°C, puede ser convertida en U/L turbidimétrico a 37°C con trioleína como sustrato, multiplicando el resultado por 6.2.

A fin de evitar contaminaciones se recomienda no utilizar las cubetas y utensilios que se hayan usado para la determinación de triglicéridos.

CONTROL DE CALIDAD

SPINTROL. Normal y patológico.

UNIDAD VII

PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO CARDIOVASCULAR

1. INTRODUCCIÓN

El metabolismo altamente anaeróbico del corazón le permite usar como combustible muchos sustratos normalmente presentes en el plasma, y la absorción cardíaca de la mayoría de estos sustratos es proporcional a su concentración arterial una vez que ciertos niveles son excedidos. En términos generales, el corazón usa los ácidos grasos libres como su combustible predominante. También consume importantes cantidades de glucosa y lactato, así como cantidades más pequeñas de piruvato, cuerpos cetónicos y aminoácidos. La mayor parte de la energía para la función cardíaca se obtiene de la descomposición de metabolitos a través del ciclo del ácido cítrico y la fosforilación oxidativa. Estas vías enzimáticas se encuentran principalmente en las mitocondrias, representando aproximadamente un 35% del volumen total del músculo cardíaco.

Enzimas en las células miocárdicas

Varias enzimas encontradas en el tejido miocárdico son clínicamente importantes debido a que su liberación en el torrente sanguíneo puede estar relacionada con el daño y la muerte de las células miocárdicas.

Creatina cinasa

La enzima responsable de la regeneración del ATP es la creatina cinasa. Tiene un peso molecular de 85,000 daltones y existe en diversas formas isoenzimáticas. La creatina cinasa (CC) es un dímero, compuesto de las dos subunidades M (músculo) y B (cerebro). Las tres isoenzimas formadas a partir de estas subunidades se encuentran en el "citosol". Estas isoenzimas se abrevian como MM, MB, y BB. Si comparamos la actividad de la enzima en varios tejidos, el músculo esquelético tiene por mucho la mayor actividad, poseyendo unas 50,000 veces la concentración de la CC sérica. La isoenzima esquelética predominante es la isoenzima MM, con sólo trazas de las isoenzimas MB y BB en la mayoría de las fibras musculares. El componente MB, sin embargo, está incrementado en ciertos trastornos musculares, particularmente en la distrofia muscular tipo Duchenne y en la polimiositis. La actividad de CC del músculo esquelético medida en unidades internacionales es aproximadamente de 2000 U/g, comparada con la actividad del músculo cardíaco de 500 U/g. En suero normal, por lo menos el 95% de la CC presente es del tipo MM que probablemente se deba principalmente a fugas del músculo esquelético, particularmente durante la actividad física. Debido a esto, la actividad de la CC sérica en personas activas saludables muestra una distribución asimétrica inclinada hacia valores más altos. Además, los valores son más bajos en las mujeres que en los hombres y son más bajos en la mañana que en la noche. Los valores tienden a ser más bajos en pacientes hospitalizados,

posiblemente debido a que el reposo en cama reduce la cantidad de enzimas liberadas del músculo.

Isoformas de CC

Las isoenzimas CC-MM y CC-MB en suero pueden ser fraccionadas en subtipos o "isoformas" mediante técnicas de alta resolución, tales como electroforesis de alto voltaje o enfoque isoelectrico. Las isoformas de CC-MM y CC-MB se forman en la sangre mediante la ruptura enzimática irreversible del aminoácido del COOH terminal, un residuo de lisina, de la subunidad M o de las subunidades de las isoenzimas del tejido. Para la CC-MM, esta ruptura involucra la remoción sucesiva de los residuos terminales de lisina de cada subunidad M, dando lugar a tres isoformas llamadas MM3 (forma tisular, o Mlisina Mlisina), MM2 (o MlisinaM), y MM1 (o MM). La CC-MB, que tiene una sola subunidad M, consiste de dos isoformas en la circulación, la llamada MB2 (forma de tejido, o MlisinaB), y MB1 (o MB). Es de notar que la secuencia amino terminal de la subunidad B de la CC es similar al de la subunidad M, sin embargo, la ruptura de la lisina terminal de la subunidad B de la CC-MB permanece controversial.

Lactato deshidrogenasa

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima tisular ubicua que cataliza la reducción de piruvato a lactato usando nicotinamida adenina dinucleótido (NAD). La LDH de un peso molecular de aproximadamente 140,000 daltones y es un tetrámero compuesto de cuatro subunidades con peso molecular de 35,000 daltones cada una. Las subunidades, que son de dos tipos, H (corazón) y M (músculo), se combinan para formar las cinco isoenzimas de LDH. La principal isoenzima (HHHH) tiene una actividad máxima en presencia de bajas concentraciones de piruvato, pero se inhibe por exceso de piruvato. Por contraste, la principal isoenzima muscular (MMMM) exhibe actividad máxima en presencia de una mayor concentración de piruvato y se inhibe menos por exceso de piruvato. El corazón metaboliza los ácidos grasos y los carbohidratos a una velocidad aproximadamente constante con oxidación completa del piruvato a través del ciclo de Krebs del ácido cítrico. Por lo tanto, el corazón tiene una baja concentración tisular de piruvato y lactato y rápidamente convierte el lactato del plasma en piruvato. Por contraste, el músculo, con rápidas demandas de incrementos de energía durante el ejercicio, tiene que contender con rápidos incrementos en piruvato y lactato de tejido causados por el metabolismo anaeróbico.

La LDH se encuentra en el citosol de todas las células humanas y por lo tanto tendría poca especificidad para el diagnóstico a no ser por el hecho de que las isoenzimas están presentes en diferentes proporciones en cada tejido. El corazón y los eritrocitos contienen principalmente LDH₁ y LDH₂, mientras que el músculo esquelético y el hígado contienen LDH₅ y en menor grado LDH₄. El suero normal contiene principalmente LDH₂, con menores cantidades de LDH₁ y de las otras isoenzimas. Si las enzimas son liberadas del tejido cardíaco al suero, a menudo vemos un cambio en la proporción de LDH₁ a LDH₂. La vida media de la LDH es diferente para cada isoenzima; la isoenzima 1 (HHHH), tiene una vida media de aproximadamente 100 horas, mientras que la isoenzima 5 (MMMM) tiene una vida

media de sólo 10 horas. La importancia de esto es evidente en la discusión de la liberación de las enzimas durante el infarto al miocardio.

Aspartato aminotransferasa

La aspartato aminotransferasa (ASAT) cataliza la transferencia de un grupo amino entre el ácido aspártico y el piruvato para formar oxaloacetato (alfa cetoglutarato) y alanina. Esta enzima ubicua es esencial en el metabolismo intermedio y permite que los aminoácidos ácido aspártico y ácido glutámico se degraden en el ciclo de Krebs. La enzima existe en dos formas estructuralmente diferentes; una se encuentra principalmente en el citoplasma y la otra en las mitocondrias. La forma citosólica es la que se encuentra en el suero. Su vida media en el suero es probablemente de alrededor de 20 horas. El hígado tiene la mayor actividad enzimática, con aproximadamente 85 U/g de tejido, mientras que el corazón posee 75 U/g y el músculo esquelético cerca de 50 U/g.

Proteínas contráctiles

Los marcadores bioquímicos más comúnmente usados para lesión del miocardio están involucrados con el metabolismo de las células, son solubles y están localizados en el compartimento citosólico de las células. Debido a estas propiedades, una gran proporción de estos marcadores citosólicos son liberados rápidamente en la circulación después de una lesión celular. Por contraste, la naturaleza y función de las proteínas estructurales determina que sean solubles; por consiguiente una proporción relativamente pequeña está libre en el citosol y disponible para su rápida liberación poco después de una lesión celular. A esta pequeña proporción disponible para liberación se le denomina el "reservorio citosólico".

A pesar de la desventaja teórica de su insolubilidad, se ha generado bastante interés en las siguientes proteínas estructurales: troponina I, troponina T, y las cadenas ligeras de miosina. La base de este interés clínico surge de la identificación y purificación de formas cardíacas de estas proteínas con alta especificidad tisular, que se discuten adelante con mayor detalle, han permitido el desarrollo de ensayos inmunológicos para la determinación de lesiones miocárdicas.

Miosina, actina y troponina

Las proteínas miosina y actina forman la mayor parte del aparato contráctil de las células musculares. Juntas constituyen el 80% de la proteína de las células musculares. Las proteínas reguladoras troponina y tropomiosina, en asociación con la actina polimerizada, forma los filamentos delgados del sarcómero. La troponina consiste de un complejo de tres subunidades: troponina C, troponina I, y troponina T.

Troponina T (TnT)

La proteína troponina T, de 37 kilodaltones, tiene un reservorio citosólico que constituye cerca del 6% de su concentración intracelular total. A pesar de encontrarse tanto en el tejido esquelético como en el corazón, la TnT está siendo usada exitosamente como un marcador para la enfermedad cardíaca isquémica

debido a que un subtipo encontrado en el tejido miocárdico tiene una homología de solamente 60% con la forma del músculo esquelético. Se han desarrollado anticuerpos altamente específicos que discriminan entre los subtipos de los músculos cardíacos y esqueléticos.

Troponina I (TnI)

Al igual que la TnT, la TnI es parte integrante del aparato contráctil estructural tanto del músculo esquelético como del miocárdico. Se cree que el reservorio citosólico de TnI es el mismo que el de TnT, esto es, cerca del 6% de la concentración total de TnI de las células. La TnI, con un peso molecular de 21 kilodaltones, es ligeramente más pequeña que la TnT. El subtipo cardíaco de la TnI tiene varias regiones de aminoácidos que difieren substancialmente de la forma del músculo esquelético. Estas regiones sirven como base para los inmunoensayos cardíacos específicos.

Cadenas ligeras de Miosina (CLMs)

La miosina es una molécula de filamentos largos (540 kD) compuesta por seis cadenas de péptidos, dos de las cuales son pesadas (230 kD) y cuatro son ligeras (CLMs), con pesos moleculares en el rango de 26 kD. Las CLMs están formadas por dos componentes, la cadena ligera de miosina-1 y la cadena ligera de miosina-2, que juntas constituyen el filamento grueso del aparato contráctil en el músculo esquelético y miocárdico. Las CLMs de fuentes cardíacas y no cardíacas pueden ser diferenciadas usando anticuerpos específicos para CLMs cardíacas. Debe notarse que el reservorio citosólico para las CLMs es de 0.5% de la cantidad total de células, y solamente cerca del 10% del reservorio citosólico para TnT o TnI.

7.1 Creatin-kinasa Creatincinasa Método cinético UV. NAC activado

1. INTRODUCCIÓN

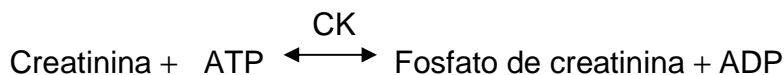
Se encuentra más abundancia de CK en el músculo esquelético. Las otras fuentes en que se encuentra, por orden de mayor a menor actividad, son: cerebro, recto, estómago, vejiga, colon, útero, próstata, intestino delgado y riñón. Se detectan cantidades despreciables en hígado, placenta y tejido tiroideo.

La CK se eleva principalmente cuando hay afecciones o enfermedades que afectan el tejido músculo esquelético, el miocardio o el cerebro. Se observan notables incrementos de CK total en infarto agudo al miocardio, en afecciones del músculo esquelético y después de un choque o colapso circulatorio. En general la CK se eleva en infarto agudo al miocardio y es de gran utilidad clínica para detectarlo. La CK total comienza a incrementarse después de 15 horas de ocurrir un infarto agudo al miocardio. La actividad máxima se observa a las 24 horas y regresa a la normalidad a los 3 días. La miocarditis también provoca actividad notablemente alta de CK durante la fase inflamatoria de la afección.

La CK se eleva además en diversas enfermedades o lesiones del músculo esquelético.

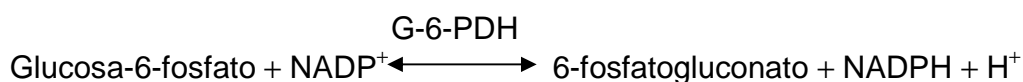
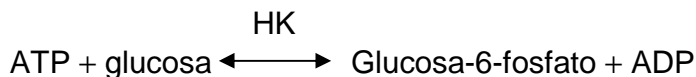
Los valores de creatinina y sus isoenzimas se utilizan en el diagnóstico y tratamiento de los infartos de miocardio y de miopatías como la distrofia muscular progresiva tipo Duchenne.

La creatinina (CK) es una enzima del citoplasma y la mitocondria que cataliza tanto la formación de ATP como la fosforilación reversible de creatinina, con el ATP como grupo donador de fosfato. La CK requiere activadores metálicos, particularmente Mg^{2+} , para que la enzima alcance toda su actividad catalítica.



La actividad de CK es de particular importancia en el tejido muscular, en donde cataliza la síntesis de fosfato de creatinina, una molécula que almacena enlaces de alta energía. Para efectuar una contracción muscular se utiliza el grupo fosfato para formar ATP a fin de proporcionar de inmediato energía a los músculos.

Hay diversos métodos analíticos para determinar la actividad de CK ya sea mediante la reacción hacia la derecha (creatinina \rightarrow fosfato de creatinina) o la reacción inversa. Estos métodos son análisis de punto final o cinéticos, en los que se emplean técnicas de espectrofotometría, fluorescencia o bioluminiscencia. El método de referencia para el análisis de CK es el de Oliver y Rosalki, un análisis cinético en el que se emplea la secuencia de reacción "inversa".



En donde HK = hexocinasa y G-6-PDH = deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato.

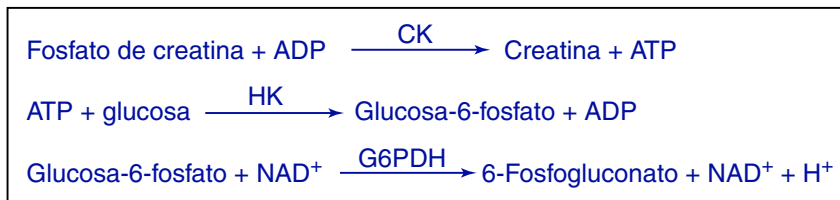
2. OBJETIVOS

- ✓ Aplicar el manejo adecuado de la técnica para la determinación de la Creatin cinasa
- ✓ Establecer los valores de referencia de la enzima CK y comparar con el valor de nuestra muestra problema a analizar.
- ✓ Definir cuales son las principales patologías que se presentan si tenemos valores altos o bajos de CK.

3. FUNDAMENTO DE LA METODOLOGÍA

Se mide la actividad de la creatincinasa mediante un método cinético enzimático.^{1,2,3,4} En la reacción, la creatincinasa cataliza la transferencia de un grupo fosfato del sustrato fosfato de creatina al difosfato de adenosina (ADP). La subsiguiente formación de trifosfato de adenosina (ATP) se mide mediante el uso de dos reacciones asociadas, catalizadas por la hexocinasa (HK) y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), lo que produce dinucleótido de nicotinamida adenina reducida (NADH) a partir del dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD). El ensayo (CK) contiene el activador monotioglicerol.

ESQUEMA DE LA REACCIÓN QUÍMICA



S015197L.EPS

4. PREPARACIÓN

4.1 MUESTRA CLINICA

Suero, plasma heparinizado ó con EDTA.

4.2 MATERIAL Y REACTIVOS

Material necesario

Pipetas de 2 mL y 200 µL

Fotómetro termostable a 37°C con filtro de 340 nm.

Cronómetro

CONTENIDO DEL EQUIPO

Reactivo 1 Imidazol pH 6.7, 100 mmol/L

Tampón Glucosa 20 mmol/L

Acetato Magnesio 10 mmol/L

EDTA 2 mmol/L

Reactivo 2 ADP 2 mmol/L

Comprimidos AMP 5 mmol/L

Diadenosin-5-P 10 mmol/L

NADP+ 2 mmol/L

Hexoquinasa (HK) 2500 U/L

G-6-PDH 1500 U/L

N-acetilcisteina 20 mmol/L

Creatin-fosfato 30 mmol/L

La estabilidad del monoreactivo es de 5 días a 2-8°C ó 24 horas a temperatura ambiente.

La actividad de la CK en suero disminuye un 10% al cabo de un día a 2-6°C ó 1 hora a 15-25°C.

5. PROCEDIMIENTO 5.1 TECNICA

Longitud de onda 340 nm ,334 nm, 365 nm
Temperatura 25/30/37°C
Cubeta 1 cm paso de luz
Lectura frente aire o agua dest.

| | | |
|-----------------|---------|--------|
| | 25-30°C | 37°C |
| Reactivo al uso | 2.5 mL | 2.5 mL |
| Muestra | 100 µL | 50 µL |

Mezclar e incubar 2 minutos.

Verter la solución a la cubeta, leer la extinción y poner en marcha el cronómetro. Repetir la lectura a 1,2 y 3 minutos. Calcular $\Delta E/\text{min}$.

6. RESULTADOS 6.1 Cálculo

A 25/30°C

340 nm $\Delta E/\text{min}$ x **4127** = U/L

334 nm $\Delta E/\text{min}$ x **4207** = U/L

365 nm $\Delta E/\text{min}$ x **7429** = U/L

A 37°C

340 nm $\Delta E/\text{min}$ x **8095** = U/L

334 nm $\Delta E/\text{min}$ x **8260** = U/L

365 nm $\Delta E/\text{min}$ x **14751** = U/L

6.2 Linealidad

A 334 nm y 340 nm hasta $\Delta E/\text{min}$ de 0.250

A 365 nm hasta $\Delta E/\text{min}$ de 0.140

Para valores superiores, se diluirá la muestra a 1:10 con solución salina 0.9%

6.3 Límite de Seguridad Biológica

25°C

30°C

37°C

| | | | |
|---------|-----------|------------|------------|
| Hombres | 10-80 U/L | 15-130 U/L | 24-195 U/L |
| Mujeres | 10-70 U/L | 15-110 U/L | 24-170 U/L |

Factores de conversión de temperaturas

| Temp. Reacción | 25°C | Temperatura deseada 30°C | 37°C |
|-------------------|------|-----------------------------|------|
| 25°C | 1.00 | 1.56 | 2.44 |
| 30°C | 0.64 | 1.00 | 1.56 |
| 37°C | 0.41 | 0.63 | 1.00 |

NOTAS

La hemólisis interfiere en la prueba a concentraciones superiores a 200 mg/dL de hemoglobina.

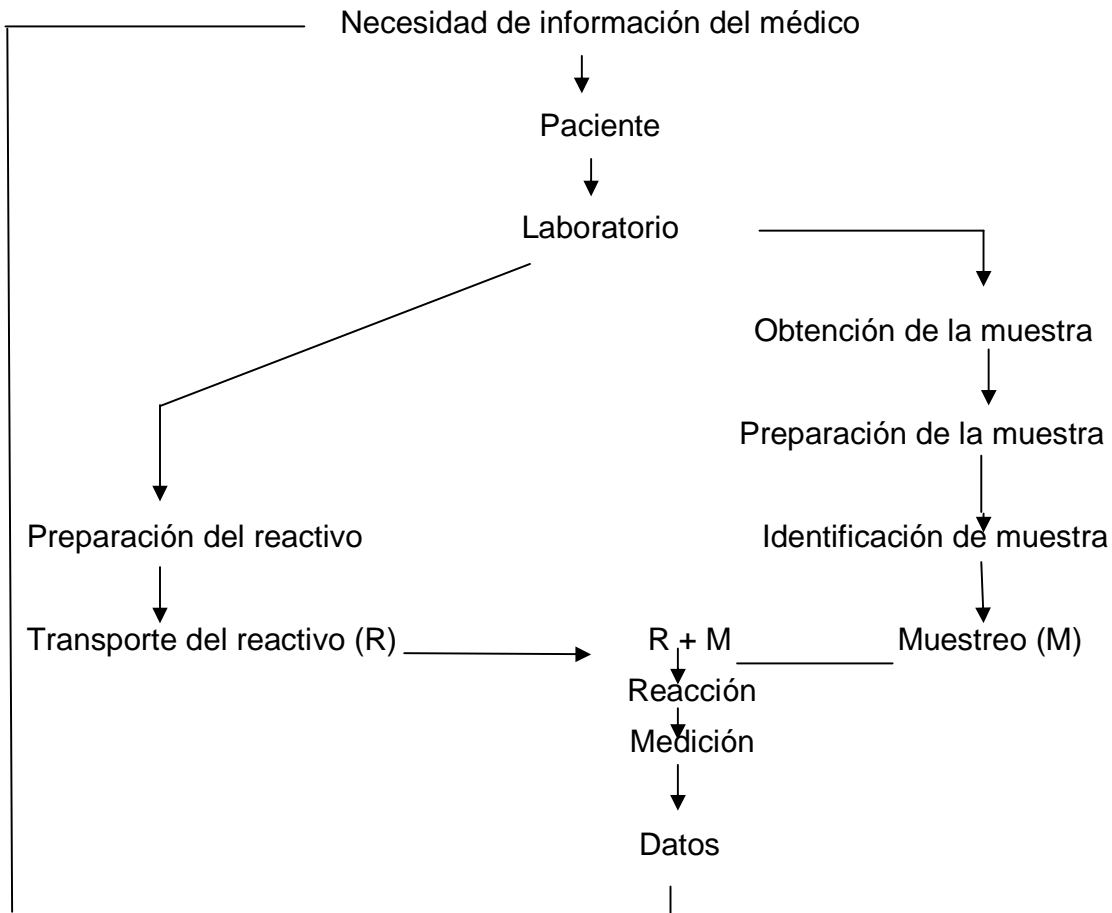
UNIDAD VIII

EQUIPO AUTOMATIZADO UTILIZADO EN QUÍMICA CLÍNICA

1.0 INTRODUCCIÓN

El término automatización se refiere a la técnica, método o sistema para hacer funcionar o controlar un proceso mecánico o productivo por medios automáticos como dispositivos electrónicos. Cuando se aplica a la química clínica, la palabra automatización se refiere a un método mecánico para llevar a cabo procesos analíticos. La mayoría de los instrumentos analíticos automáticos se diseñan para efectuar los pasos repetitivos en la determinación de diversas concentraciones de analitos o sustancias problema en muestras de pacientes, principalmente suero, con un mínimo de intervención del operador. Existe gran cantidad de instrumentos automatizados y cada uno de ellos tiene algo que ofrecer para mejorar el funcionamiento del laboratorio, por lo que es necesario valorar con exactitud las necesidades específicas del laboratorio y sus objetivos.

Cada sistema automatizado incluye diversos pasos, que reflejan los que se llevan a cabo en el análisis manual.



Tipos de errores

Confusión de muestras:

Muestras etiquetadas en el área administrativa con números de entrada equivocados.

Sueros transferidos a tubos mal marcados en el área de preparación de muestra.

Cuando una muestra se sacó de la rueda de muestras del autoanalizador, y al introducir una muestra de urgencia se anota un número incorrecto de la copa y se asignan valores falsos a todas las muestras en la rueda.

Intercambio de tubos analíticos durante la toma de muestra con pipeta, o colocación errónea de pipetas en los soportes de las mismas de las cuatro posiciones del espectrofotómetro.

Fallas técnicas de los aparatos

Lecturas de cuadros incorrectas:

Lecturas incorrectas de los máximos del autoanalizador

Lecturas incorrectas de la curva estándar

Lectura de la curva estándar asignada a una muestra equivocada

Lecturas de la curva estándar equivocada

Dilución y errores de cálculo:

Olvidos de los analistas para corregir los resultados en la dilución.

Muestras diluidas por el analista de primer turno y analizadas por un analista del segundo turno, que no fue informado de la dilución anterior.

Reactivo y solución estándar:

Agua destilada en lugar de amortiguadora, para preparar un reactivo.

Medidor de un pH estandarizado con amortiguador equivocado.

Reactivo contaminado.

Uso de sustrato o solución estándar caducado.

Problemas por instrumentos:

Reloj lento para una reacción medida.

Registrador no calentado adecuadamente; lectura blanco inestable.

Utilización de balanzas descalibradas para pesar cualquier sustancia, estándares.

Otros:

Muestras dejadas a temperatura ambiente.

El analista del primer turno deja muestras para ser analizada por el analista del segundo turno y este último no se presenta a trabajar. El análisis de la muestra queda pendiente para el siguiente día, lo que por otra parte dependiendo de la muestra obligará a tomar la decisión de realizar o no el análisis.

La exposición prolongada de la luz de la habitación puede destruir constituyentes como la bilirrubina.

2.0 OBJETIVOS

- ✓ Qué el alumno maneje correctamente el equipo automatizado y realice las determinaciones correspondientes a la asignatura de análisis clínicos (dependiendo de los reactivos en stock).
- ✓ Que el alumno lleve a cabo las cartas de control de calidad y las interprete.

3.0 FUNDAMENTO

Los equipos por su moderna tecnología se ajustan adecuadamente a las necesidades: flexibilidad, seguridad y economía. Asimismo, las características y diseño hacen de los autoanalizadores adaptables a múltiples usos. Pueden utilizarse como auto-analizadores principales en la Química Clínica diaria o bien como analizadores de inmunoproteínas y en el análisis de drogas.

Los autoanalizadores en general, integran un diseño óptimo superior de gran precisión junto con un bajo mantenimiento y un volumen inferior de reactivos.

- Química Clínica.
- Proteínas especiales.
- Drogas de abuso.
- Monitorización de drogas terapéuticas
- Electrolitos.
- 180 tests/hora.
- 300 tests con módulo ISE.
- Autonomía de 4.5 horas.
- Incorporación de sensores de nivel
- *Random acces.*
- Carga continua.

- Test de incompatibilidad.
- Identificación por códigos de barras.

Sencillez: mayor facilidad de manejo gracias al nuevo sistema de software integrado basado en el sistema *Windows*.

Instrucciones de mantenimiento integradas en el software.

Aprendizaje fácil y rápido.

Control de calidad: los resultados del control de calidad se almacenan en la memoria y pueden visualizarse fácilmente en la pantalla.

El software efectúa el cálculo de la desviación principal y el coeficiente de variación.

Validación de los resultados mediante sistema *Westgard*.

Integración: Se integra perfectamente en su laboratorio.

La conexión bidireccional al servidor permite recibir instrucciones y transmitir resultados al sistema principal.

CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS

Dependiendo de la marca y modelo los autoanalizadores cuentan con:

SISTEMA DE REACTIVOS

- Rotor con 24 posiciones para contenedores de 25 μL y 8 posiciones para contenedores de 5 μL . Todas las posiciones pueden ser asignadas como R1 o R2. Se incluyen adaptadores para los contenedores de 5 μL en las posiciones de 25 μL .
- 5 pares de posiciones para 25 μL pueden usarse con contenedores de 50 μL .
- Volumen de reactivo 1 entre 110 y 400 μL .
- Volumen de reactivo 2 entre 0 y 180 μL .
- Rotor de reactivos refrigerado aprox. 12° por debajo de la temperatura ambiente.
- Cánula de reactivos atemperada con sensor de nivel y agitador integrados.
- Consumo medio de reactivo por test: 250 μL .

SISTEMA DE MUESTRAS

- Rotor de muestras que contiene en el segmento exterior 51 posiciones para muestras y/o calibradores y 24 posiciones interiores para: 3 urgencias, 1 blanco, 9 calibraciones, 5 muestras pediátricas, 4 controles, 1 solución lavado y 1 activador ISE.
- Carga continua.
- Todas las posiciones pueden contener tubos primarios de 5 µL o copas de muestra.
- Disponibles rotores especiales (opcional) para tubos KADE y SARSTEDT.
- Volumen de muestra entre 1 y 30 µL por test.
- Cánula de muestra con sensor de nivel y agitador integrados.

CAPACIDAD

Modo mono:

- Hasta 180 test/hora (modo mono)
- Hasta 300 test/hora con unidad ISE.

Modo dual:

- Hasta 133 test/hora (modo dual)
- Hasta 220 test/hora con unidad ISE.

PREDILUCIÓN MUESTRAS (solo modo dual)

- Diluciones programables: 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50 con 3 diluyentes posibles.

SISTEMA DE PIPETEO

- Jeringas Hamilton y válvula de bloqueo.
- Jeringa de reactivo: 1000 µL.
- Jeringa de muestra: 100 µL.

ROTOR DE REACCIÓN

- Rotor semi-desechable con 48 posiciones de lectura. Paso de luz de 7 mm.
- Volumen mínimo de medición de 220 µL.
- Temperatura de trabajo 37°C controlado por elementos Peltier.

ESTACIÓN DE LAVADO

- Lavado de cubetas con 4 x 500 µL de agua.
- La unidad está equipada con sensor de líquido.

FUENTE DE LUZ

- Lámpara de cuarzo-ioduro 12V-20W. (Puede variar de acuerdo al modelo).

LONGITUDES DE ONDA

- Selección automática mediante una rueda de filtros (340, 405, 436, 505, 546, 578, 620 nm).
- Ancho medio de banda de 8 a 12 mm.

RANGO FOTOMÉTRICO

- -0.1 a 3.0 Absorbancia.

MODOS ANALÍTICOS

- Medición cinética con chequeo de linealidad.
- Medición bicromática de punto final con o sin blanco de reactivo bicromático y/o corrección por blanco de muestra.
- Medición a dos puntos.
- Gráfica de los puntos de medición.
- Curvas de calibración no-lineales.

CONDICIONES DE TRABAJO

- 15-32°C
- Humedad máxima 80%.

CAPACIDAD DE MEDICIÓN (MODO MONO) (Puede haber variación de acuerdo al modelo)

- Absorbancia de reactivo (bicromática) antes de la adición de la muestra.
- Cinética durante 7 minutos después de la adición de la muestra.
- Punto final (bicromático) 11.5 minutos después de la adición de la muestra.
- Cinéticas a 2 puntos.

CAPACIDAD DE MEDICIÓN (MODO DUAL) (Puede haber variación de acuerdo al modelo)

- Absorbancia de reactivo (bicromática) antes de la adición de la muestra.
- Cinética 1 a 4.5 minutos después de la adición de la muestra (puede usarse como blanco muestra en cinética 2).
- Cinética 2 a 4 minutos después de la adición del reactivo 2.
- Cinética 1+2 a 8.5 minutos después de la adición de la muestra.
- Blanco de muestra (bicromático) antes de reactivo 2.

- Punto final (bicromático) 4.5 o 11.5 minutos después de la adición de la muestra.
- Cinética 1, Cinética 2 o Cinética 1+2 que pueden medir en un tiempo mínimo o bien 2 mediciones para las determinaciones a 2 puntos.

MODOS DE CÁLCULO

- Chequeo de efecto prozona para determinaciones inmunológicas.
- Definición de cut-off.

CONTROL DE CALIDAD

- Pueden definirse hasta 15 controles, 3 por test.
- Reglas Westgard
- Gráficos de Levey-Jennings.

STANDARDS

- CE, Certificado CB.

IDIOMAS

- Inglés, Alemán, Español, Francés, Italiano y Holandés.

DIMENSIONES

(Varían de acuerdo al modelo)

- 115 x 49 x 56.

OPCIONAL

PC(requisitos mínimos)

- Pentium 133 Mhz; 32 MB RAM
- VGA Monitor 640 x 480 pixels
- Hard disk: 1GB
- Floppy: 3.5" (1.44 MB)
- CD Rom Drive
- Windows 95 o 98
- 2 puertos serie: 1 para el instrumento y otro para el HOST.
- 1 puerto para la impresora.

IMPRESORA

- El programa puede trabajar con 2 impresoras: una para informes y otra para datos de calibración y del sistema.

- Pueden usarse las impresoras compatibles con Windows.

OTROS

- Lector de código de barras.
- Contenedor para desechos concentrados.

4.0 PREPARACIÓN

Dependerá del autoanalizador.

5.0 PROCEDIMIENTO

El equipo cuenta con un software integrado con las indicaciones de trabajo, o parámetros.

ANEXO GLOSARIO

Acidosis. pH del fluido corporal anormalmente bajo. Respiratoria -causada por una PCO_2 anormalmente alta; Metabólica-causada por una concentración de bicarbonato anormalmente baja.

Acidosis láctica. Acidosis (pH sanguíneo bajo) causado por exceso de ácido.

Adipsia. Ausencia de sed.

Aditivo. Sustancia química que al añadirse a una muestra causa uno o más cambios en sus propiedades físicas o químicas.

Adsorber. Acoplamiento de una sustancia química a una superficie sólida.

Aerosol. Una fina niebla producida por la atomización de un líquido.

Agua corporal total (ACT). Toda el agua contenida en el cuerpo, tanto dentro como fuera de las células, incluyendo aquellas contenidas en los sistemas gastrointestinal y genito-urinario.

Agua extracelular (AEC). Agua externa a las membranas; anatómica: toda agua externa a las membranas celulares; fisiológica: plasma y agua corporal en la cual pequeños solutos pueden difundirse; excluye la porción transcelular del agua anatómica extracelular; incluye el plasma y el fluido intersticial.

Agua intracelular (AIC). Agua contenida en las células del cuerpo; agua dentro de las membranas celulares.

Agua libre. Agua que no contiene soluto.

Agua transcelular. La porción de agua extracelular que está rodeada por una membrana epitelial, cuyo volumen y composición se determinan por la actividad celular de esa membrana.

Alcalosis. pH del fluido corporal anormalmente alto; respiratoria: causada por una PCO_2 anormalmente baja; metabólica: causada por una concentración de bicarbonato anormalmente alta.

Albuminuria. Incremento en la concentración de albúmina en la orina.

Aldosterona. Hormona mineralocorticoide secretada por la corteza adrenal que influye en el metabolismo del sodio y el potasio.

Alícuota. Una pequeña parte de una determinada muestra, la cual tiene la misma composición química.

Aminoaciduria. Exceso de uno o más aminoácidos en la orina.

Análisis bicromático. Monitoreo espectrofotométrico de una reacción a dos longitudes de onda. Usado para corregir el color de fondo.

Análisis cinético. Análisis en el cual el cambio del parámetro que se está controlando con respecto al tiempo está relacionado con la concentración, como el cambio de absorbancia por minuto. Las mediciones son hechas muy tempranamente en el período de reacción.

Análisis húmedo de orina. Prueba de tamizaje de la orina que combina una valoración fisicoquímica y un examen del sedimento urinario en una preparación húmeda no coloreada.

Análisis de orina por tira húmeda. Examen químico de la orina empleando tiras reactivas de prueba para la determinación de albúmina, glucosa, cetonas, bilirrubina, hemoglobina, bacterias, leucocitos, y otros constituyentes químicos.

Análisis de punto final. Monitoreo de una reacción después de que ésta se ha completado esencialmente.

Análisis por tira reactiva. Uso de tiras de prueba conteniendo reactivos químicos para determinar si hay concentraciones patológicas de diversas sustancias en la orina.

Anastamosis. Conexión de dos vasos sanguíneos.

Angiogénesis. Una complicación de la diabetes mellitus. Proliferación anormal de los vasos sanguíneos en un tejido tal como las lentes del ojo.

Angiopatía. Una complicación de la diabetes mellitus que se manifiesta como un daño en las membranas basales de los vasos sanguíneos.

Angiotensina. Polipéptido vasopresor producido por la acción enzimática de la renina sobre el angiotensinógeno. Una enzima convertidora del pulmón extrae dos aminoácidos C-terminales del decapeptido inactivo angiotensina I para formar el octapeptido biológicamente activo angiotensina II.

ANSI (American National Standard Institute). Miembro de la organización internacional para la estandarización.

Anticoagulante. Una sustancia que puede suprimir, retrasar o evitar la coagulación de la sangre impidiendo la formación de fibrina.

Anticuerpos de las células de los islotes (ACI). Anticuerpos frecuentemente encontrados en la diabetes tipo I que sugieren un origen autoinmune.

Antiséptico. Una sustancia química la cual reduce el número de bacterias.

Arterial. Relacionado con o derivado de las arterias, los vasos que conducen sangre del corazón a los tejidos del cuerpo.

Bacteriuria. Presencia de bacterias en la orina.

Bilirrubinuria. Presencia de bilirrubina en la orina.

Blanco de muestra. Muestra más diluyente; usada para corregir la absorbancia de la mezcla completa de reacción para el color endógeno de la muestra.

Blanco de reactivo. La mezcla de reacción menos la muestra: usado para restar el color del reactivo endógeno de la absorbancia de la reacción completa (más la muestra).

Cálculos. Concreciones anormales, usualmente compuestos de sales, presentes en el sistema urinario u otros tejidos; una piedra renal.

Capilar. Relacionado con un vaso sanguíneo muy delgado en los tejidos donde los nutrientes son depositados y los productos de desecho son removidos por la sangre.

Catéter. Un tubo de hule o plástico que conecta una cavidad del cuerpo con la superficie del cuerpo.

Cateterización. Inserción de un instrumento delgado, flexible y tubular en la vejiga o uréter para obtener o sacar orina.

Células pálidas. Neutrófilos de tinción tenue, hinchados y degenerados, que se encuentran en la orina diluida, los cuales tienen gránulos citoplasmáticos que presentan un movimiento browniano característico.

Cetoacidosis diabética. Una complicación de la diabetes mellitus caracterizada por hiperglucemia, hiperosmolaridad, pH bajo, cetonuria y cetonemia, y letargo o coma.

Cetona. Cualquier compuesto que contiene un grupo carbonilo -CO- y grupos de hidrocarburos unidos al carbono del grupo carbonilo.

Cetonemia. Exceso en la sangre, de cetonas y de derivados de cetoácidos.

Cetonuria. Exceso en la orina, de cetonas y de cetoácidos derivados. Presencia de cetonas en la orina, las cuales son un producto intermedio del metabolismo de las grasas, como ocurre en la diabetes mellitus.

Cilindros. Estructura cilíndrica formada como resultado de conglutinación de células y precipitación de proteínas en el lumen de los túbulos convolucionados distales y ductos colectores del nefrón, los cuales son expulsados en el sedimento urinario.

Cilindros hialinos. Cilindros transparentes formados de mucoproteína.

Cilindruria. Presencia de cilindros en la orina.

Cirrosis. Enfermedad progresiva del hígado caracterizada por el daño a las células del parénquima hepático.

Citodiagnóstico de orina. Análisis especializado de orina que combina una valoración fisicoquímica y un examen del sedimento urinario concentrado teñido para Papanicolaou.

CLIA o CLIA'88. La Reforma para el Mejoramiento de los Laboratorios Clínicos (CLIA'88 por sus siglas en inglés), reglamenta el funcionamiento de los laboratorios clínicos en los Estados Unidos. Esta ley se interpreta mediante regulaciones administrativas desarrolladas por organizaciones certificadoras.

Coágulo. Agregación de células sanguíneas unidas por fibrina, una proteína polimerizada.

Coma no cetósico heperglucémico hiperosmolar (CNHH). Una complicación de la diabetes mellitus caracterizada por hiperglucemia, heperosmolaridad, pH bajo, niveles normales de cetoácidos y letargo o coma.

Control de la calidad externo. Programa en el cual una institución externa provee muestras desconocidas para su análisis. (Vea: Survey o proficiency testing specimen. Encuesta o especímenes para ensayos de aptitud). Los resultados son

remitidos a los laboratorios participantes con una evaluación de rendimiento: "aceptable o no aceptable". En el CLIA '88 este proceso se conoce con el nombre de ensayos de aptitud.

Control de calidad interno. Programa analítico que verifica la aceptabilidad y estabilidad de los resultados del laboratorio, mediante la utilización de muestras controles.

Corrección de Allen. Análisis multicromático de una reacción para corregir la absorbancia de fondo. Además de la Amax (absorbancia máxima) del cromóforo, se monitorean dos longitudes de onda para restar la absorbancia de fondo promedio.

Cristales amorfos. Precipitado de sales no cristalino, granular, sin importancia patológica.

Desviación estándar usual (DEU). Es el promedio de los valores de las desviaciones estándar de 3 a 6 meses, basados en datos consecutivos de control de calidad. Es un estimado de la precisión, que un sistema analítico es capaz de alcanzar.

Desviación estándar (DE). Es un indicador descriptivo de la extensión de la dispersión de una población de resultados de ensayos o de un conjunto de datos.

Desviación estándar mensual. Desviación estándar calculada con los valores de control de la calidad diarios durante un mes.

Diabetes insípida. Excreción crónica de grandes cantidades de orina hipoosmótica causada por la incapacidad de concentrar la orina debido a la carencia de la producción, secreción o efecto de la hormona antidiurética, HAD.

Diabetes gestacional. Intolerancia a la glucosa que ocurre en algunos embarazos.

Diferencia significativa. Aquella que se demuestra estadísticamente que está más allá del límite de variabilidad esperado; clínicamente es una diferencia suficientemente grande para influir en una decisión médica; operacionalmente es una diferencia estadísticamente significativa que el personal que realiza el ensayo y los supervisores consideran suficientemente grande para requerir una investigación.

Disacárido. Dos monosacáridos ligados por una unión glucosídica.

Diurético. Un agente que promueve la producción de orina.

EDTA. Ácido etilendiaminotetraacético, es un agente quelante de calcio, de uso común. Actúa como anticoagulante y preservativo, uniendo calcio y otros cationes. Por sus propiedades quelantes, es capaz de inactivar varias enzimas necesarias para la formación del coágulo y para la degradación de proteínas y lípidos en sangre.

Eritrocituria. Presencia de eritrocitos en orina.

Eritrocituria dismórfica. Presencia de fragmentos de eritrocitos en el sedimento de orina indicativos de hematuria renal (glomerular y tubular).

Estándar primario. Sustancias químicas de la más alta pureza conocida, que pueden ser usadas para producir calibradores para sistemas analíticos.

Estasis. Una disminución en el flujo de sangre en una parte del cuerpo.

Evaporación. Transformación de agua en vapor

Extracelular. Fuera de las células.

Flebotomía. Punción de una vena con una aguja con el propósito de obtener una muestra de sangre.

Fluido intersticial (FI). Agua extravascular, extracelular.

Fuera de control. Condición en la cual un sistema de análisis es rechazado para ser utilizado en la atención de los pacientes, debido a los resultados de control de la calidad o a otros indicadores. Esta circunstancia debe ser declarada formalmente por el director del laboratorio o por el supervisor técnico.

Funguria. Presencia de hongos en la orina.

Glucolítico. Relacionado con el proceso del metabolismo de la glucosa.

Gluconeogénesis. Producción de glucosa a partir de ácido pirúvico.

Glucosa. Un aldehído polihidroxílico de seis carbonos; fuente principal de energía en los organismos. Su metabolismo produce adenosín trifosfato.

Glucosilación. Reacción en la cual la glucosa se une covalentemente a la proteína.

Glucosuria. Cantidades excesivas de glucosa urinaria.

Gravedad específica. El peso de una sustancia comparada con un volumen igual de otra sustancia tomada como estándar.

Grupo semejante. Cuando se utiliza en programas de control externo, indica el grupo de laboratorios que utilizan métodos iguales o similares.

HDL. Lipoproteínas de alta densidad. Estos complejos lipo-proteicos se llaman también alfa-lipoproteínas y son las más densas de las lipoproteínas. Su acrónimo más usado es HDL por "High-Density Lipoprotein."

Hematuria. Presencia de sangre en la orina.

Hemoconcentración. El proceso de incremento en la concentración de las células, proteínas y ocasionalmente otros compuestos analizados en sangre a través de la pérdida de agua, ya sea in vitro o in vivo.

Hemoglobinuria. Presencia de hemoglobina libre en la orina.

Hemólisis. Ruptura de glóbulos rojos, liberando al suero o plasma los contenidos en ellos.

Heparina. Un anticoagulante el cual inhibe directamente la formación de fibrina.

Hidrómetro. Instrumento empleado en medir la gravedad específica de un fluido.

Hiperaldosteronismo. Trastorno causado por la secreción excesiva de aldosterona y caracterizada por alcalosis hipopotasémica, debilidad muscular, hipertensión, poliuria, polidipsia y concentraciones normales o elevadas de sodio plasmático.

Hipercloremia. Concentración anormalmente alta de cloruro plasmático.

Hipernatremia. Concentración anormalmente alta de sodio plasmático.

Hiperosmótica. Que denota una presión osmótica efectiva mayor que la del plasma.

Hiperpotasemia. Concentración anormalmente alta de potasio plasmático.

Hipertónica. Que denota una presión osmótica teórica mayor que la del plasma.

Hiponatremia. Una concentración anormalmente baja de sodio plasmático; por dilución: hiponatremia causada por un exceso de agua (con respecto al sodio) en el compartimento extracelular.

Hipopotasemia. Concentración anormalmente baja de cloruro plasmático.

Hiposmótico. Que denota una presión osmótica efectiva menor que la del plasma.

Hipotónico. Que denota una presión osmótica teórica menor que la del plasma.

Hormona antidiurética (/HAD). Hormona peptídica de la neurohipófisis que actúa en el túbulo colector del riñón para permitir un incremento de la reabsorción de agua y por lo tanto una disminución de la excreción de agua libre por el riñón. También se conoce como vasopresina.

Ictericia. Referente al color anaranjado impartido a la muestra debido a la presencia de bilirrubina.

IDL. Lipoproteínas de densidad intermedia. Este complejo lipoproteico tiene una densidad entre VLDL y LDL, es de una vida media relativamente corta y en la sangre de una persona sana están en muy bajas concentraciones. En personas con disbetalipoproteinemia su concentración en sangre es elevada. Su acrónimo más usado es IDL por "Intermediate-Density Lipoprotein."

Infradiano. Cambios en la concentración de compuestos analizados que ocurren con menos frecuencia que una vez al día.

Interferente. Cualquier fenómeno químico o físico que pueda interferir o detener una reacción o proceso.

Intraindividual. Dentro de una sola persona.

Intravenoso. Dentro de una vena; generalmente se refiere a los fluidos intravenosos, en donde el agua contiene medicamentos, glucosa, o electrolitos que son administrados a un paciente a través de un catéter insertado en una vena.

In Vitro. Literalmente, en vidrio; ocurre en una situación artificial, como en un tubo de ensayo.

In vivo. Ocurre en un organismo vivo.

LDL. Lipoproteínas de baja densidad. Este complejo lipoproteico es también llamado beta-lipoproteína y es el producto final del catabolismo de la VLDL. Es el mayor transportador del colesterol. Su acrónimo más usado es LDL por "Low-Density Lipoprotein."

Levadura. Microorganismo unicelular nucleado que se reproduce por gemación.

Límites de acción. Rangos de valores establecidos para las mezclas de control de calidad. Si los resultados están por fuera de estos límites puede existir un deterioro en la calidad de los sistemas analíticos, que debe ser investigado por el técnico.

Límites de control. Límites numéricos, (expresados en las unidades de los ensayos), dentro de los cuales deben hallarse los valores de una muestra de control, para que el ensayo pueda ser considerado válido o dentro de control.

Lipemia. Presencia de partículas de lípidos (generalmente lipoproteínas de muy baja densidad) en la muestra, que le dan a la muestra un aspecto turbio.

Lipoproteínas. Complejo lípido (apoproteína)-proteína correspondiente a unas familias de macromoléculas con conocidas propiedades físicas químicas y fisiológicas conocidas.

Materiales de referencia certificados (MRC). Un material de referencia, que tiene uno o más de sus valores garantizados por un procedimiento válido. Está acompañado o respaldado por un documento expedido por un organismo certificador. El material tiene una alta pureza del componente especificado.

Método. El principio metodológico usado en la elaboración de un ensayo: el fundamento químico o físico del mismo.

Método de referencia. Un método investigado profundamente, en el cual se da una descripción precisa y clara de los procedimientos y condiciones necesarias para la determinación exacta de uno o más valores. La exactitud y precisión documentadas para el método se corresponden con la utilización del método para evaluar la exactitud de otros métodos, para medir valores de la misma propiedad, o para asignar valores a materiales de referencia.

Método definitivo. El método analítico que ha sido sometido a la investigación y evaluación de todas las fuentes de inexactitud incluyendo la inespecificidad.

La magnitud de la imprecisión final del método y el sesgo, expresados en la declaración de incertidumbre, son compatibles con el propósito e implementación final del mismo. El valor final de un método definitivo es tomado como "valor verdadero".

Mioglobulinuria. Presencia de hemoglobina en la orina, esta es una proteína que se combina con el oxígeno de las células musculares.

Monosacárido. Un aldehído o acetona polihidroxílico tal como la glucosa, fructosa o manosa.

Nefritis. Inflamación del riñón.

Neuropatía. Una complicación de la diabetes mellitus atribuida al daño de los glomérulos y capilares asociados con el glomérulo.

Oliguria. Excreción anormalmente baja de orina, o sea, menor de 400 mL/ día en un adulto.

Osmol. El número total de moles de un soluto en solución después de su disociación.

Osmolaridad. Concentración osmótica expresada en osmoles o miliosmoles de soluto por litro de solvente.

Osmosis. Movimiento de agua a través de una membrana semipermeable de una solución con baja concentración de partículas de soluto a una solución con alta concentración de partículas de soluto.

Piuria. Cantidad anormal de leucocitos en orina.

Plasma. La parte líquida de la sangre en el torrente sanguíneo; es una muestra obtenida de sangre mediante la colecta con un anticoagulante, con una centrifugación posterior de la muestra.

Polidipsia. Consumo excesivo de fluido secundario a una sed extrema; polidipsia psicogénica secundaria a un trastorno psiquiátrico, sin una lesión orgánica demostrable. Un síntoma de la diabetes mellitus.

Polifagia. Hambre constante. Un síntoma de la diabetes mellitus.

Polisacárido. Un carbohidrato compuesto de más de dos monosacáridos unidos por puentes glucosídicos.

Poliuria. Pérdida urinaria excesiva. Un síntoma de la diabetes mellitus.

Porfirinas. Un grupo de derivados del pirrol libres de hierro o magnesio que se encuentran universalmente en todas las células. Estos compuestos constituyen la base de los pigmentos respiratorios en animales y plantas.

Postprandial. Después de comer.

Presión osmótica coloidal. La presión osmótica efectiva del plasma y el fluido intersticial a través del endotelio capilar, mayormente resultante de la presencia de proteína.

Procedimiento. Grupo de instrucciones para utilizar un método, que genera un resultado analítico.

Proteinuria. Incremento en la concentración de proteína en la orina.

Proteólisis. El proceso de degradación de las proteínas, el cual puede ocurrir por reacciones químicas o procesos enzimáticos.

Pseudohiperpotasemia. Concentración plasmática de potasio anormalmente alta en una muestra obtenida de un paciente, en ausencia de una verdadera elevación de la concentración plasmática de potasio en ese paciente.

Quelación. El proceso de unión de una molécula orgánica (quelante) con múltiples iones metálicos.

Quilomicrones. Grandes complejos lipoproteicos formados en el intestino y que tienen una importante función en el transporte de grasas (mayormente triglicéridos dietarios).

Rechazo falso. Rechazo de una serie porque los resultados de control de la calidad indican un problema analítico que no está realmente presente.

Rechazo verdadero. Rechazo de una corrida analítica porque los especímenes de control indican que existe un problema real.

Recuento de Addis. Análisis cuantitativo del sedimento urinario, en el cual se cuantifica el número de eritrocitos, leucocitos y cilindros en un espécimen de orina recolectado en un determinado tiempo.

Revisión delta. Comparación de la concentración de un compuesto analizado en la muestra de un individuo, con la misma concentración existente en la muestra anterior, de la misma persona.

Semipermeable. Permeable a ciertas moléculas pero no a otras; generalmente permeable al agua.

Separador de suero. Un componente mecánico que separa físicamente el suero y las células (los separadores de plasma separan plasma de las células), previniendo los cambios en la concentración de los compuestos analizados séricos debido al metabolismo celular.

Síndrome de secreción inapropiada de la hormona antidiurética. Conjunto de hallazgos, incluyendo la hipotonicidad del plasma, hiponatremia e hipertonicidad de la orina con excreción continuada de sodio, el cual es producido por una excesiva secreción de HAD y que mejora con la restricción de agua.

Suero. La parte líquida de la sangre que queda después de que se ha formado un coágulo.

Tendencia. Cambio gradual en los resultados de las muestras de control de la calidad, que sugiere un problema con el sistema analítico o con el material de control.

Torniquete. Un dispositivo mecánico (como una banda ancha de hule) usada en la superficie de una extremidad la cual comprime las venas, haciéndolas aparecer más grandes mediante la prevención del retorno de sangre al corazón y pulmones.

Turbidez. Dispersión de luz en un líquido que contiene partículas suspendidas.

Ultradiano. Cambios en la concentración de los compuestos analizados los cuales ocurren en un período de tiempo mucho menor que un día.

Urobilinógeno. Grupo de compuestos incoloros formados por la reducción de la bilirrubina conjugada por la acción de bacterias intestinales. Cerca del 1% del total del urobilinógeno producido pasa a la orina.

Valor asignado. Es el valor medio, establecido para un compuesto analizado en una mezcla de control de calidad.

Variabilidad inherente. Los valores de las mediciones repetidas de un mismo material varían alrededor de una media. La desviación estándar mide la magnitud de esta variabilidad.

Variación cíclica. Cambios en concentración de compuestos analizados los cuales ocurren repetitivamente, en una forma predecible, durante un período dado de tiempo.

Variación circadiana. Cambios en la concentración de compuestos analizados la cual ocurre durante el transcurso de un día.

Variación preanalítica. Factores que alteran los resultados de una prueba de laboratorio y que ocurren antes de realizar la prueba.

Virus. Agente que se autorreplica, consta de una estructura fundamental de ácidos nucleicos encapsulados por una cubierta de proteínas. Este microorganismo puede multiplicarse solamente dentro de las células de su hospedero.

VLDL. Lipoproteínas de muy baja densidad también llamadas pre-beta lipoproteína.⁽¹⁾

5. BIBLIOGRAFÍA:

1. TERRÉS Speziale Arturo M; *Clínica y Laboratorio: Ciencia y Tecnología*; 2ª ed; ed. Graphimed S.A. de C.V; México 2002.
2. PRESIDENCIA DE LA REPÚBLICA; CGEA, *Guía técnica para la elaboración de manuales de procedimientos*; Colección guías técnicas, serie organización y métodos núm. 9.
3. México, Secretaría de Salud, Norma Oficial Mexicana NOM-166-SSA1-1997, para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos, Diario Oficial de la federación, año 2000. Internet: <http://www.salud.gob.mx/>
4. El gerenciamiento del laboratorio de análisis clínicos con la visión de la calidad total.
Internet: <http://www.sarda.org.ar/Revista%20sard%c3%A1/2002/28-33.pdf>
5. ANDERSON, Shauna C, Susan Cockayne; *Química Clínica*; 1ª ed; trad. Ma. Teresa Aguilar; ed. Interamericana-McGraw-Hill; México, 1995.
6. KAPLAN, A. Lawrence, Amadeo J. Pesce; *Química Clínica Teoría, análisis y correlación*; 3ª ed; trad. Tania Carreón Valencia; ed. Javier Ortega Ceseña; México 1996.

7. GONZÁLEZ Buitrago J.M., Arilla Ferreriro E., Rodríguez-Segada M., Sanchez Pozo A; *Bioquímica Clínica*; 1ª ed; ed. McGraw-Hill; México, 1998.
8. Examen de sangre.
Internet:http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp_imagepages/10026.htm
9. MORÁN Villatoro Luis; *Obtención de muestras sanguíneas de Calidad analítica*; 1ª ed; ed. Médica Panamericana S.A. de C.V; México D.F. 2001.
10. BECTON, DICKINSON DIAGNOSTICS; *BD Vacutainer Oder of Draw for Multiple Tube Collections*. Internet: www.bd.com/vacutainer.
11. A.A. Madrid, C.S.C.; *Laboratorio Clínico, Manual de Flebotomía*. Internet: www.ilustrados.com/documentos/manualflebotomia.doc
12. Norma-Oficial Mexicana Nom-087-ECOL-SSA1-2002 Protección Ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico-Infeciosos-Clasificación y especificaciones de manejo.
Internet:<http://www.salud.gob.m/unidades/cdi/nom/087ecolssa.html>
13. WHITEHEAD T.P.; *Manual, Principios de Control de Calidad (Lab/76.1)*; Organización Mundial de la Salud; Química Clínica 1984.
14. Reactivos para diagnostico clínico, Bioquímica Clínica, Productos.
Internet: <http://www.spinreact.com/>
15. TRESELER Kathleen Morrison; *Laboratorio clínico y pruebas de diagnóstico*; 3ª ed; trad. Dr. Jorge Mérito; ed. El manual moderno; México, D.F, 1998.
16. AYRES H. Gilbert; *Análisis Químico Cuantitativo*; 2ª ed; ed. Harla S.A de C.V.; México 1970.
17. FLASCHKA H.A.; *Química Analítica Cuantitativa*; 9ª.ed; trad. Antonio Eroles Gómez; ed. Continental S.A. de C.V; México 1984.
18. GRAW Allan, Cowan Robert A; *Bioquímica Clínica*; 2a. ed; ed. A.Hamabata; México D.F. 2003.
19. BAYER; *Manual de usuario Rapidchem 744/754*.
20. GRAFF Sister Laurine; *Análisis de Orina, Atlas a color*; 1ª ed; trad. Pablo Rubén Koval; ed. Médica Panamericana S.A; México 1983.
21. ALTHOF Klinder Heintz; *Sedimento Urinario*; 6ª.ed; ed. Médica Panamericana; México 2003.

