



Material  
Didáctico  
para Estudiantes

GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS:

# Bioquímica Clínica I

FQByF

Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia



Universidad Nacional  
de San Luis

# **SERIE DIDÁCTICA: MATERIAL DIDÁCTICO PARA ESTUDIANTES**

## **Guías de Trabajos Prácticos: Bioquímica Clínica I**

Dra. Myriam L. FORNERIS  
Dra. María Florencia FIGUEROA  
Esp. María José LÓPEZ  
Esp. Margarita Y. FLORES

FACULTAD DE  
QUÍMICA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS

2018

Decana

***Dra. Mercedes Edith CAMPDERRÓS***

Vice Decana

***Dra. Lucía Beatriz FUENTES***

Secretaria académica

***Dra. Estela Isabel GASULL***

Comisión de la Serie Didáctica

Coordinadora

***Dra. María Cristina ALMANDOZ***

Integrantes

Departamento de Bioquímica  
y Ciencias Biológicas

***Dra. Susana I. SÁNCHEZ***

***Dra. Verónica P. FILIPPA***

Departamento de Farmacia

***Dr. Luis A. DEL VITTO***

***Dra. Alejandra O. MARIA***

Departamento de Química

***Dra. Yamina A. DÁVILA***

***Dra. María de los Ángeles ÁLVAREZ***

## SUMARIO

La publicación periódica Serie Didáctica ha sido creada en el ámbito de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis (Ordenanza N° 008/07-CD) con el fin de proporcionar material de estudio a los estudiantes de las Carreras de grado impartidas en la Facultad.

Actualmente, la SERIE DIDÁCTICA: MATERIAL DIDÁCTICO PARA ESTUDIANTES (Resolución N° 269/16) ofrece guías de Trabajos Prácticos de Laboratorio y de campo, guías de resolución de problemas, material teórico, propuestas de estudios dirigidos y comprensión de textos, entre otros materiales, elaborados por el cuerpo docente de las diferentes Áreas de Integración Curricular de la Facultad. Estas producciones didácticas significan un aporte para cubrir necesidades académicas acorde al enfoque de cada asignatura o que no se encuentran habitualmente en bibliografía específica. Las mismas están disponibles en la página de la UNSL ([http://www.fqbf.unsl.edu.ar/mda\\_guias.html](http://www.fqbf.unsl.edu.ar/mda_guias.html)) lo que facilita la accesibilidad por parte de los estudiantes, docentes y comunidad educativa en general, garantizando la calidad de la visualización y la amplia difusión del material publicado en este sitio. De igual modo, la Serie Didáctica realiza una extensión invitando a docentes y alumnos de diferentes niveles educativos a participar, crear, producir y utilizar este espacio fomentando así el vínculo entre esta Institución y la comunidad.

En nuestra opinión, es de vital importancia producir y compartir el conocimiento con los estudiantes y la sociedad. De este modo, se tiende a facilitar los procesos de enseñanza y de aprendizaje y la transmisión de una idea directriz de conducta humana y científica, fortaleciendo los vínculos entre docentes-alumnos-conocimientos y sociedad.

Dado que la presente SERIE DIDÁCTICA resulta de la participación de numerosos actores, ante los posibles errores humanos y cambios en la ciencia, ni los editores ni cualquier otra persona que haya participado en la preparación del material didáctico garantizan íntegramente que la información sea precisa o completa

## PRESENTACIÓN DEL CURSO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA I

La presente guía de Teórico-Práctica pertenece a la asignatura **BIOQUÍMICA CLÍNICA I** que se enmarca en el Ciclo Profesional del Plan de Estudio (11/10) de la Carrera de Licenciatura en Bioquímica. El Curso se dicta en el primer cuatrimestre de 5° año (noveno cuatrimestre), es de carácter obligatorio y posee un crédito horario de 150 horas.

**Requisitos para cursar Bioquímica Clínica I.** El alumno deberá tener regularizadas las asignaturas: Bacteriología y Virología, Parasitología y Química Biológica Patológica. Para rendir debe aprobar previamente las mencionadas materias y la Práctica Profesional.

**Modalidad de cursada.** El Programa del Curso se desarrollará mediante el dictado de *clases teóricas* y *clases prácticas*, que comprende por semana: dos clases teóricas (4 h), explicación teórica de trabajos prácticos (2 h), un trabajo prácticos de laboratorio y/o de aula para la resolución de problemas de aplicación o casos clínicos (3 h) y seminarios de integración y actualización que incluyen la discusión de casos clínicos. De acuerdo con la reglamentación vigente, la regularización de la materia se logrará alcanzando el 80% de asistencia a las actividades obligatorias y con la aprobación de tres evaluaciones parciales que se realizarán a lo largo del cuatrimestre.

El contenido del Curso tiene como objetivo estudiar el fundamento, la realización e interpretación de los métodos analíticos a utilizar en el Laboratorio Clínico, y su integración con el conocimiento fisiopatológico de diferentes enfermedades relacionadas a los sistemas: Digestivo, Cardiovascular, Renal, Respiratorio, Nervioso y Óseo. Además, se han incluido los conceptos básicos de calidad total en los que un laboratorio de Análisis Clínicos debe fundamentarse para verificar y asegurar la calidad del servicio.

Los objetivos específicos del curso son: 1) Lograr que el alumno incorpore e integre los conocimientos teóricos y prácticos sobre los contenidos de la asignatura. 2) Abordar los conceptos de organización y control de calidad en el Laboratorio Clínico. 3) Capacitar al alumno para seleccionar métodos, interpretar y evaluar los resultados en un contexto clínico. 4) Desarrollar habilidades para la utilización de equipamiento manual y automatizado en análisis clínicos. 5) Formar un Profesional Bioquímico que en base a los conocimientos adquiridos pueda ejercer sus actividades en el ámbito oficial, privado o de investigación.

En la presente Guía el alumno encontrará los fundamentos teóricos y la metodología para la realización de los trabajos prácticos.

Los docentes del Curso de Bioquímica Clínica esperamos que los alumnos descubran la importancia que tiene esta materia en la formación del Bioquímico. Así mismo, promover el desarrollo de una actitud crítica para que los conocimientos adquiridos se conviertan en el futuro en elementos para un mejor desempeño de su actividad profesional.

## ÍNDICE

Presentación de la Asignatura	I
Bioseguridad en el Laboratorio Clínico	IV
<b>Trabajo Práctico N° 1</b>	
TOMA DE MUESTRA EN EL LABORATORIO CLÍNICO	
Objetivos	1
Introducción Teórica	1
Actividad Práctica	34
Bibliografía	36
<b>Trabajo Práctico N° 2</b>	
CONTROL DE CALIDAD EN EL LABORATORIO CLÍNICO	
Objetivos	37
Introducción Teórica	37
Actividad Práctica	62
Bibliografía	73
<b>Trabajo Práctico N° 3</b>	
ANÁLISIS DE ORINA COMPLETA	
Objetivos	74
Introducción Teórica	74
Actividad Práctica	97
Bibliografía	98
<b>Trabajo Práctico N° 4</b>	
EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN RENAL	
Objetivos	99
Introducción Teórica	99
Actividad Práctica	110
Bibliografía	123
<b>Trabajo Práctico N° 5</b>	
HOMEOSTASIS Y ALTERACIONES DEL EQUILIBRIO HIDRO-ELECTROLÍTICO	
Objetivos	124
Introducción Teórica	124
Actividad Práctica	141
Bibliografía	143
<b>Trabajo Práctico N° 6</b>	
ALTERACIONES DEL EQUILIBRIO ÁCIDO-BASE	
Objetivos	144
Introducción Teórica	144

Actividad Práctica	167
Bibliografía	170

### **Trabajo Práctico N° 7**

#### ESTUDIO DE PROTEÍNAS EN EL LABORATORIO CLÍNICO

Objetivos	171
Introducción Teórica	171
Actividad Práctica	185
Bibliografía	197

### **Trabajo Práctico N° 8**

#### EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN HEPÁTICA Y PÁNCREAS EXOCRINO

Objetivos	198
Introducción Teórica	198
Actividad Práctica	210
Bibliografía	221

### **Trabajo Práctico N° 9**

#### MARCADORES CARDIACOS EN EL DIAGNÓSTICO Y MONITOREO DEL IAM

Objetivos	222
Introducción Teórica	222
Actividad Práctica	239
Bibliografía	244

## BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO CLÍNICO



### OBJETIVOS

- Conocer los principios de la Bioseguridad en el Laboratorio Clínico.
- Evaluar los factores de riesgo biológico que ponen en peligro la salud y la seguridad en el trabajo o pueden afectar el medio o ambiente.

### INTRODUCCIÓN

El término **Bioseguridad** involucra un concepto muy amplio que está referido a la protección de la vida. Se entiende como el conjunto de medidas o normas destinadas a mantener la vigilancia, para proteger el medio ambiente, la salud y **reducir al mínimo el riesgo de exposición** de los profesionales de la salud. Por ello es importante a través de la prevención, conocer los peligros potenciales o riesgos biológicos (infeccioso y a reactivos tóxicos) capaces de producir daño.

Los **agentes de riesgo** se clasifican en: {

- \* Biológicos
- \* Químicos
- \* Físicos

**1- Agentes Biológicos:** Incluyen bacterias, virus, hongos y parásitos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) en su Manual de Bioseguridad en el Laboratorio clasifica a los microorganismos infectantes en distintos grupos de riesgo según el peligro que implican al individuo y a la comunidad (Cuadro 1).

**2- Agentes Químicos:** Comprenden a todas las sustancias que por contacto o por inhalación puedan producir efectos tóxicos leves, moderados o graves, por ejemplo: ácidos, álcalis, solventes, etc.

**3- Agentes Físicos:** Incluyen a los riesgos térmicos, eléctricos, radiaciones ionizantes, etc. Acerca de estos agentes físicos, es conocido que existen en la actualidad leyes y reglamentaciones específicas.

El personal de Laboratorio, al manipular materiales biológicos como sangre, suero, exudados, heces, orina, tejidos, se expone a situaciones de riesgo que se incrementan cuando están presentes agentes infecciosos como virus de hepatitis (A, B, C y D) o virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), ya que estos se transmiten por sangre y/o fluidos corporales. Además, se incluyen a las infecciones ocupacionales debido a derrames de material infeccioso, inoculación percutánea con agujas y material cortopunzante, contacto



con heridas abiertas, piel escoriada y membranas mucosas, aspiración de pipetas con la boca; laceración o cortadura con material de vidrio roto, entre otros.

**Cuadro 1.** Clasificación de microorganismos infecciosos por grupos de riesgo (OMS, 2005).

---

**Grupo de riesgo 1** (*riesgo individual y poblacional escaso o nulo*)

Microorganismos que tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades en el ser humano o animales.

**Grupo de riesgo 2** (*riesgo individual moderado, riesgo poblacional bajo*)

Agentes patógenos que pueden provocar enfermedades en humanos o animales pero que tienen poca probabilidad de entrañar un riesgo grave para el personal de laboratorio, la población, el ganado o el medio ambiente. La exposición en el laboratorio puede provocar una infección grave, pero existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces y el riesgo de propagación es limitado.

**Grupo de riesgo 3** (*riesgo individual elevado, riesgo poblacional bajo*)

Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades en humanos o animales graves, pero que no se propagan de un individuo a otro. Existen medidas preventivas y terapéuticas efectivas.

**Grupo de riesgo 4** (*riesgo individual y poblacional elevado*)

Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades graves en el ser humano o animales y que se transmiten fácilmente de un individuo a otro, directa o indirectamente. Normalmente no existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.

---

*El conjunto de medidas, normas y procedimientos destinados a controlar y disminuir al mínimo el riesgo biológico es lo que se conoce como “Bioseguridad”, dejando en evidencia que el “riesgo cero” no existe.*

La Bioseguridad en el Laboratorio es incumbencia de todos sus integrantes. Por ello, es importante conocer estas Normas, difundirlas, aplicarlas y concientizar a los miembros del equipo del Laboratorio como profesionales, técnicos, auxiliares, mucamas y personal administrativo. Se debe tener mucho cuidado ya que la mecanización o acostumbamiento adquiridos al realizar las tareas rutinarias, puede llevar a la imprudencia y a cometer faltas, a veces graves, tanto para nuestra propia seguridad como para la de los demás.

Un punto fundamental para entender y cumplir lo que se refiere a Bioseguridad en Salud, especialmente a nuestro trabajo como Profesionales Bioquímicos, es tener siempre presente la premisa que **“TODOS los materiales biológicos de TODAS las personas, son potencialmente infectivos”**.

Por lo antes expuesto, se desprende que la Bioseguridad, debe estar integrada a todos los procedimientos y técnicas de aseguramiento de la calidad de los procesos, para lograr:

- \* Calidad y excelencia de trabajo
- \* Seguridad personal y comunitaria
- \* Seguridad legal de nuestro trabajo
- \* Seguridad para el paciente

## I- PROGRAMA OPERATIVO DE BIOSEGURIDAD

Las designaciones del nivel de bioseguridad en los laboratorios se basan en una combinación de las características de diseño, construcción, medios de contención, equipos, prácticas y procedimientos de operación necesarios para trabajar con agentes patógenos de los distintos grupos de riesgo. En el cuadro 2, se muestra como se relacionan, **no se equiparan**, los grupos de riesgo con el nivel de bioseguridad de los laboratorios destinados al trabajo con microorganismos. Los laboratorios se clasifican en: básico (nivel 1 y 2); de contención (nivel 3) y de contención máxima (nivel 4).

**Cuadro 2.** Relación de grupos de riesgo con los niveles de bioseguridad, prácticas y equipo.

GRUPO DE RIESGO	NIVEL DE BIOSEGURIDAD	TIPO DE LABORATORIO	PRÁCTICAS DE LABORATORIO	EQUIPO DE SEGURIDAD
1	Básico Nivel 1	Enseñanza básica, investigación	TMA	Ninguno; trabajo en mesa de laboratorio al descubierto
2	Básico Nivel 2	Servicios de atención primaria; diagnóstico, investigación	TMA y ropa protectora; señal de riesgo biológico	Trabajo en mesa al descubierto y CSB para posibles aerosoles
3	Contención Nivel 3	Diagnóstico especial, investigación	Prácticas de nivel 2 más ropa especial, acceso controlado y flujo direccional del aire	CSB además de otros medios de contención primaria para todas las actividades
4	Contención máxima Nivel 4	Unidades de patógenos peligrosos	Prácticas de nivel 3 más cámara de entrada con cierre hermético, salida con ducha y eliminación especial de residuos	CSB de clase III o trajes presurizados junto con CSB de clase II, autoclave de doble puerta (a través de la pared), aire filtrado

TMA: técnicas microbiológicas apropiadas. CSB: Cámaras de seguridad biológicas.

Todos los laboratorios de diagnóstico y de atención de salud (salud pública, clínicos u hospital) deben estar diseñados para cumplir, como mínimo, los requisitos del *nivel de Bioseguridad 2*. Dado que ningún laboratorio puede ejercer un control absoluto sobre las muestras que recibe, el personal puede verse expuesto a organismos de grupos de riesgo más altos de lo previsto. Esa posibilidad debe tenerse presente en la elaboración de los planes y las políticas de seguridad. En algunos países se exige que los laboratorios clínicos estén acreditados. En general, siempre deben adoptarse y aplicarse las precauciones normalizadas.

## II- NORMAS DE BIOSEGURIDAD EN EL ÁREA DE LABORATORIO CLÍNICO

Estas Normas se refieren a pensar como equipo y no individualmente.

- Mantener el lugar de trabajo en óptimas condiciones de higiene y aseo.
- **No** se permite comer, beber, fumar o almacenar comida, así como el uso de cualquier otro elemento personal (cosméticos, cigarrillos) dentro del área de trabajo.
- **No** se debe guardar alimentos en las heladeras, freezers y otros equipos de refrigeración destinados a sustancias contaminantes o químicos.
- Utilizar guardapolvos de tela durante todo el procesamiento de las muestras, incluyendo las extracciones y lavado del material. Esta ropa protectora deberá ser quitada inmediatamente antes de abandonar el área de trabajo.
- Usar delantal plástico en aquellos procedimientos en que se esperen salpicaduras, aerosoles o derrames importantes de sangre u otros líquidos orgánicos.
- Enviar la ropa contaminada con sangre, líquidos corporales u otro material orgánico a la lavandería en bolsa plástica roja.
- Tratar a todo paciente como potencialmente infectado. Las normas universales deben aplicarse con todos los pacientes independientemente del diagnóstico, por lo que se hace innecesario la clasificación específica de sangre y otros líquidos corporales como “infectada o no infectada”.
- Observar antes de iniciar la tarea diaria que la piel de sus manos no presente cortes, raspones u otras lastimaduras. De ser así, cubrir las heridas de manera conveniente antes de trabajar.
- Lavar cuidadosamente las manos antes y después de cada procedimiento e igualmente si se tiene contacto con material patógeno.
- Utilizar en forma sistemática guantes plásticos o de látex para todo manejo de materiales biológicos o donde exista, aunque sea de manera potencial, el riesgo a exposición a sangre o fluido corporal.
- Cambiar los guantes toda vez que hayan sido contaminados. Lavarse las manos y ponerse guantes limpios.
- **No** tocarse los ojos, nariz o piel con las manos enguantadas.
- Emplear mascarilla y protectores oculares durante procedimientos que puedan generar salpicaduras o gotitas aerosoles de sangre u otros líquidos corporales.
- Usar botas y gorros en procedimientos que son potencialmente contagiosos y en servicios críticos como Unidades de Terapia Intensiva, Neonatología o Salas de Aislamiento en Clínica Médica. Conviene que todos estos elementos sean descartables.
- Evitar deambular con los elementos de protección personal fuera de su área de trabajo.

- Utilizar propipetas o pipetas automáticas para evitar el contacto con materiales contaminantes, reactivos cáusticos y/o vapores tóxicos. *Está prohibido pipetear con la boca.*
- Manejar con estricta precaución los elementos cortopunzantes: las agujas y otros elementos punzantes deberán ser descartados en un recipiente resistente. Evitar los intentos de reencapuchar, romper o doblar las agujas.
- Informar inmediatamente al superior cualquier accidente ocasionado con elementos de laboratorio.
- Desechar los residuos comunes en bolsa negra y en bolsa roja, todo material contaminado con sangre y/o secreciones, rotulándolas con el símbolo de riesgo biológico.
- Realizar desinfección y limpieza a las superficies, elementos, equipos de trabajo, al final de cada procedimiento o de la jornada de acuerdo al proceso descrito en el manual de limpieza y desinfección.
- Restringir el ingreso a las áreas de alto riesgo biológico al personal no autorizado, al que no utilice los elementos de protección personal necesarios y a los niños.
- Elaborar y seguir un procedimiento escrito para la limpieza de todos los derrames.
- Descontaminar los líquidos (contaminados) por medios químicos o físicos antes de eliminarlos por el colector de saneamiento.

### III- ELEMENTOS DE SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

(a)



(b)



Figura 1. (a) El laboratorio debe incluir un sitio para lavarse las manos. Se muestra una regadera de ojos para limpiarlos si hay contacto con algún agente infeccioso. (b) Equipo de protección personal utilizado en un laboratorio de bioseguridad nivel 3: guantes, gorro y batas desechables.

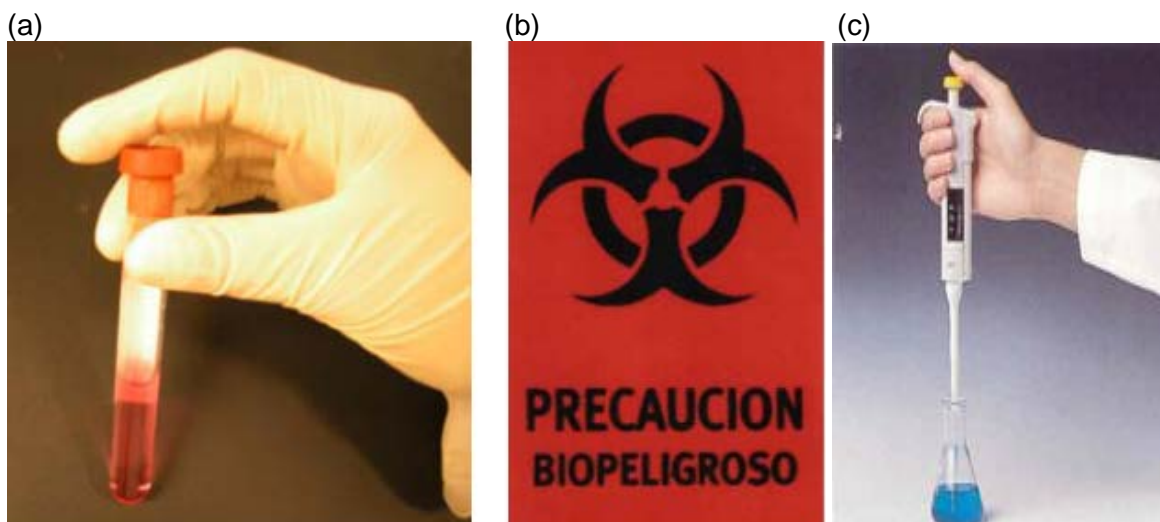


Figura 2.(a) El uso de guantes es indispensable para manipular muestras que potencialmente puedan estar infectadas. (b) Símbolo universal de bioseguridad. (c) Uso de pipetas automáticas.



Figura 3. (a) Bolsas de polietileno rojas para desecho de cultivos y cepas de agentes infecciosos además de residuos no anatómicos. (b) Contenedores rígidos de polipropileno rojo para desechos punzocortantes. La aguja se desecha sin tajarla de nuevo utilizando guantes.

#### IV- CUIDADO Y LAVADO DE MANOS

El lavado de manos con agua y jabón (Figura 4), es el método más sencillo, antiguo y útil para prevenir la propagación de agentes infecciosos de una persona a otra, protegiendo tanto al personal como a los pacientes. El propósito es la reducción continua de la flora residente y desaparición de la flora transitoria de la piel. Se considera que la disminución o muerte de ésta es suficiente para prevenir las infecciones hospitalarias cruzadas.

**a) Técnica de Lavado:**

- Tomar el jabón o la solución antiséptica.
- Abrir la canilla.
- Humedecer las manos.
- Hacer espuma.
- Friccionar vigorosamente las manos en toda su superficie.
- Enjuagar correctamente.
- Secarlas con toalla de papel desechable.



Figura 4. Técnica del lavado de manos

**b) Indicaciones para el lavado de manos con jabón común:**

- Siempre que estén visiblemente sucias.
- Después del contacto con fluidos o sustancias corporales posiblemente contaminadas (sangre, orina, materia fecal, secreciones, etc.).
- Entre el contacto con distintos pacientes.
- Al final de cada jornada.

**c) Indicaciones para el lavado de manos con jabón antiséptico - alcohol iodado:**

- Antes del contacto con recién nacidos y pacientes inmunodeprimidos.
- Después del contacto con pacientes infectados con gérmenes resistentes o de significado epidemiológico.

Si bien las soluciones antisépticas pueden ser irritantes y lesionar la piel, cabe señalar que en la mayoría de los casos el jabón común es suficiente para el lavado.

**d) Uso de guantes descartables:**

- Lavar las manos con los guantes colocados durante su uso.
- No salir del lugar de trabajo con los guantes colocados.
- Descartarlos como se describe en Normas de Material de Desecho, en los recipientes destinados a tal fin.

**e) Instrucciones del uso de guantes no descartables:**

- Colocar talco en los guantes para mejor calce y mayor duración de los mismos.
- Con los guantes colocados, lavar las manos con agua, jabón e hipoclorito cuando se observen rastros de sangre u otro material contaminante.
- Retirar los guantes al salir del sector de trabajo. En caso de no poder retirar los, no salir del lugar sin lavar previamente con agua, jabón e hipoclorito aunque no se vean sucios.
- No atender el teléfono con los guantes colocados ni tocar ningún instrumental ni materiales que no sean de la sección de trabajo.
- Al terminar la jornada, lavar los guantes cuidadosamente y entalcarlos.

**V- ZONAS DE TRABAJO DEL LABORATORIO**

La implementación de condiciones ambientales y operativas pretende garantizar la bioseguridad mediante un diseño físico y operativo en las distintas áreas del laboratorio.

1. El laboratorio se mantendrá ordenado, limpio y libre de materiales no relacionados con el trabajo.
2. Las condiciones de temperatura, iluminación y ventilación de los sitios de trabajo deben ser confortables.
3. Las ventanas que puedan abrirse estarán equipadas con rejillas que impidan el paso de artrópodos.
4. Los techos, paredes, pisos antideslizantes y en especial las mesadas de trabajo, deberán ser lisas y fáciles de limpiar.



5. Las superficies de trabajo se descontaminarán después de todo derrame de material potencialmente peligroso y al final de cada jornada de trabajo.
6. Todos los materiales, muestras y cultivos contaminados deben ser descontaminados antes de eliminarlos o de limpiarlos para volverlos a utilizar.
7. Todo equipo que requiera reparación técnica debe ser llevado a mantenimiento, previa desinfección y limpieza por parte del personal encargado del mismo. El personal del área de mantenimiento debe cumplir las normas universales de prevención y control del factor de riesgo Biológico.

### **Mantenimiento de espacios físicos y equipos de laboratorio**

1- **Limpieza General de Espacios Físicos:** Tiene por objeto disminuir la contaminación ambiental y eliminar la suciedad visible. En los establecimientos asistenciales hay gérmenes patógenos presentes en los elementos o equipos sucios o contaminados que se pueden comportar como reservorios o fuentes de infección.

El método es la limpieza para la remoción mediante el uso de agua y detergente. El hipoclorito de sodio no debe mezclarse nunca con el detergente porque produce vapores tóxicos para el personal que lo usa, además de inactivar su capacidad desinfectante. La limpieza se realizará con personal fijo del servicio, adiestrado en su trabajo.

2- **Uso y Conocimiento del Instrumental Adecuado:** El personal del Laboratorio deberá estar capacitado e informado sobre el funcionamiento y los riesgos de los distintos instrumentales de uso propio. Asimismo, deberá tener conocimiento y acceso a los Manuales de Procedimiento de los distintos equipos, elaborados por cada sección de trabajo y para cada aparato instalado.

a) *Centrífugas:* deben ser descontaminadas semanalmente. El tambor y la tapa de la centrífuga se desinfectan con alcohol al 70% o con formol al 5%, los portatubos se lavarán con agua, detergente y solución de iodopovidona (tipo Pervinox), luego con alcohol al 70%. Las microcentrífugas se deberán descontaminar diariamente.

b) *Espectrofotómetros, teléfonos y otros aparatos:* Los elementos metálicos o electrónicos no deben ser desinfectados con lavandina ni iodopovidona pues son corrosivos. Se debe utilizar alcohol al 70% o glutaraldehído al 0,5%. El instrumental debe estar apagado y esperar que se evapore el alcohol para encenderlo.

c) *Heladeras:* se limpiará por lo menos una vez al mes, con una mezcla de agua y bicarbonato de sodio. Luego con alcohol al 70%.

d) *Gradillas:* si el material lo permite se sumergirán en solución de hipoclorito de sodio al 10%. Las gradillas metálicas se desinfectarán con alcohol al 70%. Deben descontaminarse diariamente.



e) *Propipetas y pipetas automáticas*: higienizarlas diariamente con alcohol al 70%.

f) *Gomas de ligar*: higienizarlas diariamente con alcohol al 70%.

Con el fin de reglamentar las conductas de prácticas correctas de laboratorio, desinfección y procedimientos de emergencia, se deben distinguir en el laboratorio zonas de diferente riesgo de infección, como:

#### **# Zona 1: Alto Riesgo Infeccioso**

- Extracciones, separación y transporte de muestras
  - Microbiología
  - Guardia Bioquímica
  - Sección Medio Interno
  - Sección Lavado

#### **# Zona 2: Mediano Riesgo Infeccioso**

- Sección Hematología
- Sección Serología
- Sección Proteínas y Lípidos

#### **# Zona 3: Bajo Riesgo Infeccioso**

- Sección Química y de Orina
- Sección Endocrinología

#### **# Zona 4: Muy Bajo Riesgo Infeccioso**

- Administración
- Preparación de reactivos

#### **# Zona 5: No Riesgo Infeccioso**

- Computación
- Sistema de Bar

### **Va- ZONAS DE DIFERENTE GRADO INFECCIOSO**

En las secciones de diferente riesgo infeccioso como: Guardia Bioquímica, Medio Interno, etc., en numerosas oportunidades se impone la urgencia, es decir, rapidez en la entrega de los resultados y eficiencia en la calidad de los mismos, estos dos elementos nos llevan a trabajar entre los "Límites de la Bioseguridad". Por ello es importante conocer las normas de bioseguridad que se han detallado con anterioridad con el fin de aplicarlas para un correcto procedimiento en el laboratorio.

## Vb- ZONAS DE ALTO RIESGO INFECTIVO

### EXTRACCIONES, SEPARACIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS

#### # *Las muestras biológicas deben ser extraídas por personal idóneo.*

- Las muestras **NO** deben ser extraídas ni procesadas por:
  - Personal embarazada.
  - Personal con lesiones cutáneas (heridas o cortes en manos o miembros superiores, eccemas u otras lesiones dermatológicas).
  - Personal con herpes bucales.
  - Personal con inmunodeficiencias o inmunodeprimidos.

#### **Normativas para la sala de extracción:**

- Puerta de entrada amplia para el flujo libre de pacientes y sillas de ruedas.
- Cubículos suficientes con silla de extracción para flebotomía en función de la demanda de cada unidad ejecutora. Uno con camilla para atención de niños.
- Entrada y salida de acceso exclusivo para el personal de laboratorio y con comunicación al área de análisis.
- En el área de los cubículos debe existir un lavamanos y una ventanilla para el retiro de muestras del área de extracción.
- Deben existir servicios sanitarios con lavamanos, para ambos sexos de uso restringido para la toma de muestras especiales.
- Disponer de **apoya brazos** de acero inoxidable o material inalterable, recubierto con toallas descartables.
- Deberá tener **mesadas** adecuadas, de fácil limpieza, donde se delimitarán tres zonas:
  - \* Una zona para asentar papeles, marcadores, lápices, etc.
  - \* Una zona donde se colocará el material no utilizado, como ser gradillas con tubos, etc.
  - \* Una zona donde se colocará el material ya contaminado, incluyendo los tubos con sangre y recipientes para descartar agujas y jeringas.
- Deberá disponer de **recipientes para descartar agujas** y otros elementos punzantes. Dichos recipientes deben ser de plástico rígido, resistentes a las pinchaduras, descartables y con tapa. Deberán contener hasta un tercio de su altura una solución de hipoclorito de sodio al 10%, recientemente preparada, el material se dejará actuar entre 18 y 24 horas. Transcurrido ese tiempo, se le derramará la mayor

cantidad de lavandina que sea posible y se esterilizará, en estufa o autoclave, antes de su desecho en bolsas de residuos apropiadas.

- Deberá contar con **recipientes para descartar jeringas**, también de plástico rígido, de medidas aproximadas 30 cm x 30 cm x 15 cm, con solución de hipoclorito de sodio al 10%, donde se sumergirán las jeringas, aspirando algo del líquido y dejándolo actuar entre 18 y 24 horas. Para su descarte, se sigue el mismo procedimiento que para las agujas y elementos punzantes.
- Deberá ubicar en lugares específicos **recipientes para residuos**, preferentemente con tapa a pedal, provisto de una doble *bolsa de residuos de color roja*, donde serán descartados sólo los elementos que se empleen en la asistencia al paciente (algodones, gasas, papeles, etc.).

Las bolsas se cerrarán cuando se completen los dos tercios de su contenido y es aconsejable arrojar en su interior 10 ml de formol puro (formol al 40%) antes de cerrarla. La bolsa cerrada se colocará dentro de otra bolsa, tipo consorcio, que será retirada diariamente por el personal especializado de recolección de residuos para Hospitales y Sanatorios.

- Descartar los lazos, tubos de extracción y portaobjetos en los recipientes destinados a tal fin, con solución desinfectante.

## PRECAUCIONES EN LA TOMA DE MUESTRA

- a) Prestar especial atención y cuidado en el procedimiento de extracción de sangre.
- b) Desinfectar la piel del paciente en la zona de punción, friccionando con alcohol al 70% y dejar actuar un minuto antes de la punción.
- c) Cerrar de manera hermética los tubos y rotularlos antes de la extracción.
- d) Evitar accidentes por pinchazos, para lo cual se recomienda:
  - No desacoplar la aguja de la jeringa con la mano, utilizar para ello pinzas o descartadores de agujas o artefactos para tal fin.
  - No envainar con las manos la aguja con el capuchón.
  - Obturar la jeringa para su traslado o para mantener la anaerobiosis (muestras para cultivos en anaerobiosis o equilibrio ácido-base), con un cono de plástico ciego.
- e) Descartar los elementos punzantes utilizados en los recipientes rígidos señalados anteriormente.
- f) Distribuir la muestra obtenida en recipientes irrompibles, de plástico con cierre a rosca o tapón de goma o plástico.
- g) Descargar la sangre en los tubos o frascos recolectores de muestra, en forma suave, evitando aerosoles y salpicaduras. Si esto ocurre, desinfectar el mismo inmediatamente con lavandina al 10% o con alcohol al 70% u otro desinfectante.

- h) Homogeneizar la muestra, presionando el tapón con la mano, protegida con los guantes.
- i) Los tubos o frascos jamás deben ser envueltos con la solicitud médica y mucho menos colocar la misma dentro de la boca del tubo destapado.
- j) Descartar las jeringas en los recipientes destinados a tal fin, así como todo otro material utilizado en esta operación.
- k) Obtener las micromuestras con dispositivos de plástico especiales con tapa.
- l) Obturar con plastilina o algo similar, las muestras que se obtengan con capilares.
- m) Limpiar el extensor luego de realizar cada extendido de sangre, con un algodón con alcohol al 70% o sumergirlos en hipoclorito de sodio al 10%.
- o) Identificar los extendidos sanguíneos. Conviene marcarlos con marcador indeleble, procurando no tocar el frotis de sangre con los dedos.
- p) Marcar las muestras biológicas de los individuos de riesgo, mediante algún signo o leyenda (cruz, líneas paralelas, etc.), que indiquen su peligrosidad.
- r) Abandonar el lugar de extracción y repasar las mesadas con solución de hipoclorito de sodio al 10%.

### **Separación de muestras**

Las precauciones de este sector se refieren:

- A la remoción de los sueros con varillas de vidrio u otro material, cuya ejecución debe ser perfectamente controlada para evitar el contacto personal y con la mesada de trabajo.
- A la centrifugación y al potencial peligro de la ruptura de tubos.
- Al traslado de las muestras desde la sala de extracción al sector de procesamiento de muestras.

### **Recepción y traslado de otros materiales biológicos**

- El material biológico deberán transportarse tapado y acondicionado en gradillas.
- En los lugares de recepción de muestra, se debe disponer de bandejas o recipientes para el traslado de las muestras a sus respectivas secciones.
- Las muestras de orina y de materia fecal u otro líquido biológico se trasladarán en frascos tapados, dispuestos en bandejas diseñadas en forma lo suficientemente profundas y de un material de fácil lavado (metal o plástico rígido). Luego envolverlos en bolsas de polietileno doble, o cajas de plástico, convenientemente rotulados.
- Si al centrifugar se rompe un tubo, se debe sacar el portatubos dañado, desechar los restos de sangre y vidrios en un recipiente especial. Lavar el portatubos con

agua corriente y colocarlo en solución de hipoclorito de sodio al 10%. La centrifuga debe separarse para su posterior lavado.

### **Transporte de muestras para diagnóstico**

Cuando se envían muestras para diagnóstico, incluidos los materiales infecciosos, a laboratorios fuera de la institución debe cumplirse con regulaciones de seguridad. Además, debe asegurarse la integridad de la muestra de manera de obtener un análisis exacto por parte del laboratorio destinatario.

Las muestras deben ser empaquetadas y enviadas de manera de asegurarse que su contenido no se derrame o drene y que llegue en buenas condiciones. Las sustancias infecciosas se clasifican como envíos peligrosos de acuerdo con la legislación internacionalmente reconocida que se basa en las Recomendaciones para el Transporte de Muestras Peligrosas de Naciones Unidas, y en legislaciones internas vigentes propias de cada país. En consecuencia, los envíos están sujetos a los requerimientos específicos de empaquetado, documentación, etiquetado y manipulación. Debe destacarse la importancia de establecer una relación entre los grupos involucrados: el remitente, el transportador y el destinatario para lograr un transporte seguro y eficiente de los materiales.

### **Transporte de material biológico**

*El sistema de triple embalaje consta de tres cajas (Figura 5):*

- El embalaje y el transporte de material deberán seguir la reglamentación nacional o internacional. Si debe ser enviada por correo o transporte contratado, deberán cumplirse las normas internacionales al respecto (precintos, rótulos, tipos de envase, etc.).
- *Recipiente primario:* recipiente de plástico con cierre a rosca, se envuelve con el material absorbente.
- *Recipiente secundario:* recipiente impermeable de plástico resistente que protege al anterior. En la parte exterior del mismo se coloca información que identifique la muestra.
- *Envoltura exterior de envío:* ésta protege al recipiente secundario y su contenido de los elementos externos (daños físicos, agua, etc.) durante el transporte. Se debe colocar la etiqueta “sustancia infecciosa”.

### **Almacenamiento de las muestras**

- Cuando se deban utilizar cámaras frigoríficas, heladeras o freezers para conservar muestras y reactivos, los mismos se deben guardar en forma separada.
- Las muestras se colocarán en viales irrompibles, perfectamente identificadas y cerradas.
- Debe quedar un espacio no menor a dos centímetros entre la superficie de la muestra y el tapón.

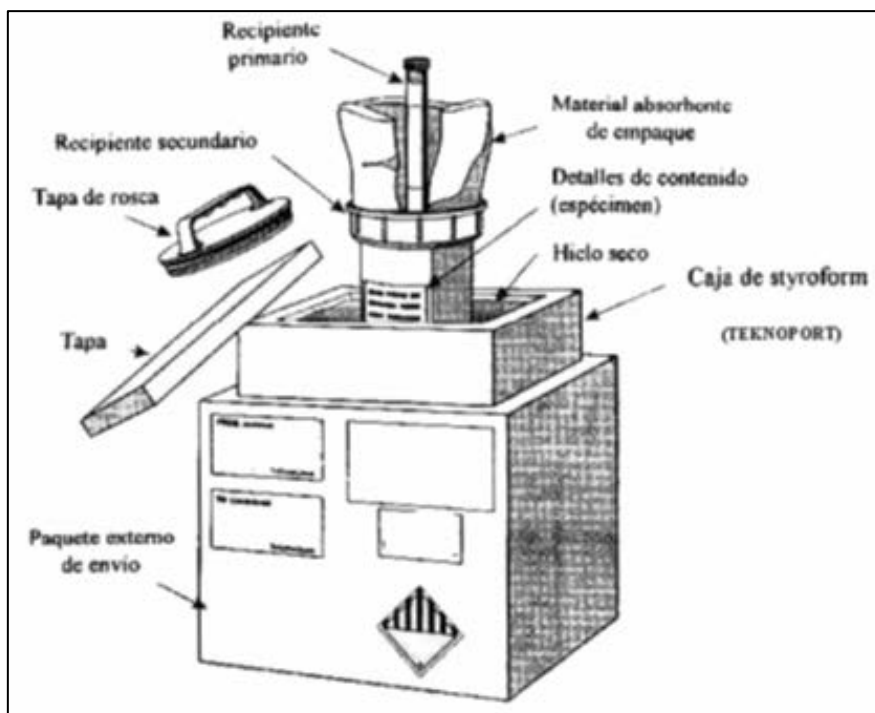


Figura 5. Sistema básico de triple embalaje

#### Procedimiento en la Sección Microbiología:

- Cumplir estrictamente las normas detalladas en el manual de procedimientos de esta sección a fin de lograr una técnica segura evitando la formación de aerosoles, ya que estos son los principales mecanismos de transmisión de infecciones en este sector.
- Usar guantes según las normas detalladas, máscaras y campanas a fin de evitar la inhalación de partículas contaminantes. Los operarios se deberán proteger los ojos mediante el uso de gafas o protectores oculares cuando se requiera.
- Utilizar barreras invisibles de protección, como flujo laminar, radiación UV, etc.
- El laboratorio debe permanecer cerrado en el horario de trabajo y evitarse al máximo la producción de corrientes de aire.
- Las mesadas y demás superficies se deben desinfectar diariamente.
- Todo material contaminado se debe esterilizar en autoclave antes de su descarte.

Es evidente que la eliminación o sustitución de los materiales peligrosos por otros seguros o menos dañinos sería lo deseable, pero no siempre es posible. Ello conduce a otro tipo de actuaciones cuya misión es separar físicamente el material peligroso del trabajador, como es la utilización de las *Cabinas de Seguridad Biológica* o *de flujo laminar* y que están basadas en la dinámica de los fluidos (Figura 6). Dichas cabinas están proyectadas para ofrecer protección al usuario y al ambiente de los riesgos asociados al manejo de material

infeccioso y otros materiales biológicos peligrosos, excluyendo materiales radiactivos, tóxicos y corrosivos.

*Cabina de Seguridad- Clase II:* La protección del trabajador está dada por la creación de una barrera de aire formada por la entrada de aire desde el local, a través de la abertura frontal, y por un flujo descendente de aire filtrado estéril (Flujo Laminar Vertical).

*Cabina de Seguridad- Clase III:* La cabina está herméticamente sellada, separando completamente al trabajador del trabajo que esté realizando mediante barreras físicas (panel frontal completamente cerrado, manipulación a través de guantes de goma). El aire es tomado del local o del exterior y filtrado (Filtro HEPA). En su extracción (100%), suele haber dos filtros HEPA montados en serie para la completa purificación del aire extraído.

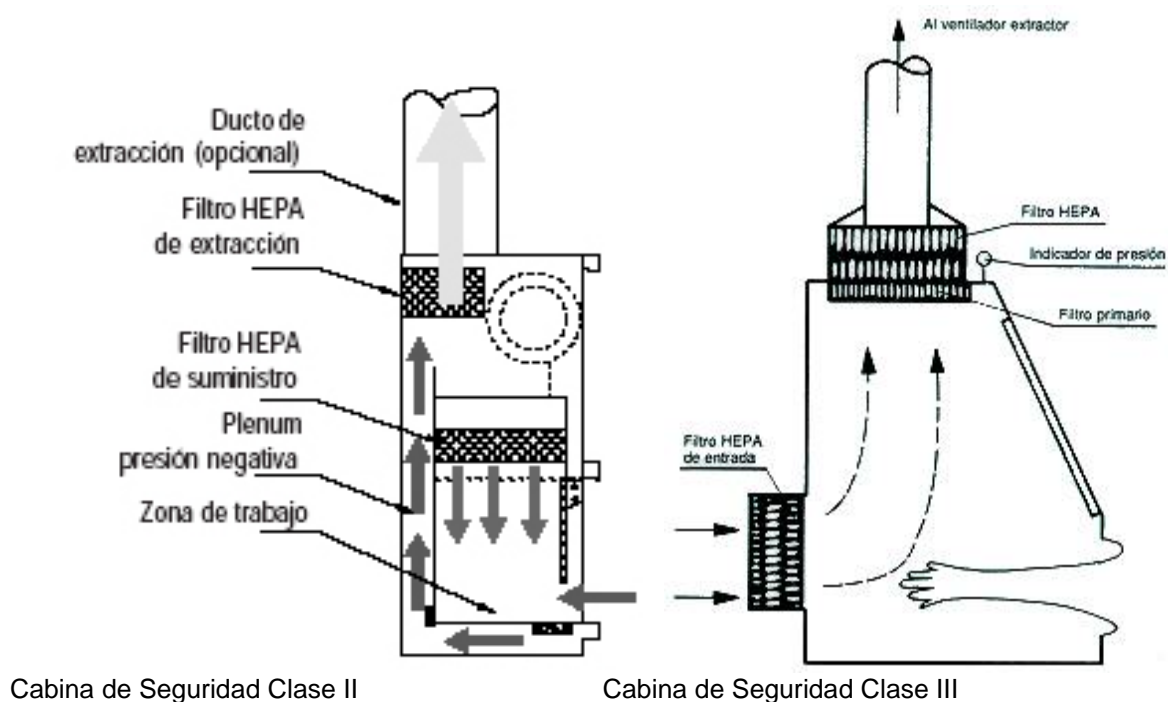


Figura 6. Cabinas de Seguridad

## VI- NORMAS DE RESIDUOS

El personal del Laboratorio debe cumplir, en los distintos sectores, las “Normas de Manejo de los Residuos”. El conocimiento de dichas normas contribuye a prevenir infecciones en el personal y se evita la contaminación del medio ambiente.

### **Residuos comunes:**

Incluye a los restos de alimentos, cajas, papeles, envases inocuos, etc., que serán descartados en bolsas rotuladas como “Basura Común”.

### **Residuos biológicos potencialmente contaminados:**

Este ítem contempla:

- a) Los residuos del laboratorio general y de microbiología.
- b) Los residuos de material que estuvo en contacto con sangre, orina, materia fecal, líquidos biológicos y muestras en general, como ser algodones, gasas, agujas, jeringas, frascos, etc.
- c) Los sobrantes de muestras de orina, coágulos de sangre, sueros, plasma, esputos, semen.

Todos estos residuos se procesan de la siguiente manera:

- A los recipientes que contienen las muestras de orina, materia fecal, semen y otros líquidos biológicos, se les debe agregar una cantidad suficiente de hipoclorito de sodio concentrado, se lo deja actuar toda la noche y al día siguiente se lo desechará por el sanitario.
- Los coágulos, sangre total, sueros, etc. se descartarán en recipientes con hipoclorito de sodio al 10%, se dejarán en contacto de 18 a 24 h y luego se desecharán por el sanitario. Finalmente se verterá lavandina pura en el sanitario y en el recipiente que los contuvo.
- Los residuos microbiológicos se consideran altamente infectivos, por lo cual deben someterse a esterilización en autoclave.
- Los materiales de desecho de cada sector de trabajo deben ser descartados en bolsas de plástico bien cerradas, rotuladas como “Basura Contaminada” y destinadas al incinerador.
- Las leyes locales pueden exigir precauciones especiales para manejar estos residuos, las cuales deben ser conocidas y aplicadas por el laboratorio.
- Los vidrios deben ser descartados en cajas de cartón, nunca en bolsas plásticas.

### **Residuos químicos:**

Los residuos químicos peligrosos incluyen sustancias combustibles, corrosivas, reactivas, tóxicas, explosivas, carcinogénicas, infecciosas y radiactivas.



**a) Pueden desecharse por la cañería:**

- Los residuos hidrosolubles (con solubilidad en agua no menor a 30 g/L), dejando correr agua en un volumen 100 veces superior al desechado.
- Los ácidos y bases fuertes (previo proceso de neutralización) deben desecharse a una velocidad no mayor a 50 mL/minuto, enjuagando con abundante agua.

**b) No pueden desecharse por la cañería:**

- Sustancias con punto de ebullición menor a 50°C (independientemente de su solubilidad).
- Mezclas o compuestos insolubles que puedan producir bloqueo en las cañerías.
- Hidrocarburos o nitrocompuestos de más de cinco átomos de carbono.
- Sustancias químicas explosivas (azidas y peróxidos).
- Polímeros hidrosolubles que forman geles.
- Sustancias químicas de alta toxicidad.

Dentro de este grupo de sustancias que **NO** pueden desecharse por cañerías, se deben clasificar en:

- 1) **No peligrosos** se desechan en “Basura Común”, considerando que:
  - El material líquido no debe ser desechado en frascos ni en bolsas si no fue previamente absorbido en material inerte.
  - El material inflamable (aerosoles, alcoholes, solventes) debe desecharse en cajas de cartón.
- 2) **Peligrosos** deben ser previamente tratados para disminuir al máximo el riesgo de toxicidad (absorción en material inerte, cierres herméticos, etc.).
- 3) **Todos los residuos** deben ser desechados en contenedores apropiados, rotulados con una descripción clara de su contenido.
  - Los líquidos de desecho de los equipos autoanalizadores serán eliminados según su riesgo biológico por las cañerías comunes de desagüe, con previo tratamiento desinfectante si el equipo no lo hiciera automáticamente.

Cuando el material a desechar es potencialmente infeccioso, existen varias alternativas para su tratamiento:

- Sellado de las cubetas de reacción después de su uso y eliminación como residuo biológico sólido.
- Descontaminación de los líquidos antes de su eliminación.
- Recolección de todos los líquidos en recipientes especiales que luego se descarten en forma segura.

## VII- NORMAS DE SEGURIDAD Y PROCEDIMIENTOS DE EMERGENCIA

### 1) Instalaciones del laboratorio:

- a) Instalaciones físicas apropiadas para el trabajo que se realiza y para su escala.
- b) Sistema de ventilación adecuada que limite la entrada de aire contaminado.
- c) Instalación de campanas y extractores.
- d) Equipos de seguridad (fuente de lavado de ojos, extinguidores de incendio, etc.).

2) Seguridad eléctrica: Control permanente de contactos, fusibles y tomas a tierra, realizados por personal idóneo.

3) Seguridad mecánica: Los equipos no deben presentar riesgo mecánico para el personal, por lo cual sus piezas móviles deben estar cubiertas.

4) Seguridad de ruido: Ningún equipo debe producir un ruido mayor de 70 dB o vibraciones excesivas.

5) Los tubos o contenedores de gas deben estar bien apoyados y asegurados. El almacenamiento y localización se elegirá según el tipo de gas y según la legislación local y nacional que los rige. En caso de detectar alguna pérdida se deberá consultar con personal de mantenimiento idóneo.

## SITUACIONES DE RIESGO MÁS FRECUENTES EN EL LABORATORIO

- **Auto inoculación accidental** debido a pinchazos o cortes con agujas, pipetas, bisturís u otros agentes punzantes.
- **Exposición de la piel o mucosas** a sangre, hemoderivados u otros fluidos biológicos contaminados, especialmente cuando la permeabilidad de las mismas se encuentra alterada por heridas, excoriaciones, eczemas, lesiones herpéticas, conjuntivitis o quemaduras.
- **Exposición a aerosoles**
- **Salpicaduras en los ojos**

## ACCIONES CORRECTIVAS FRENTE A LOS ACCIDENTES LABORALES

### Derrames:

- Cuando se produzca derrame de material potencialmente infectado, cubrir el fluido derramado con papel absorbente, volcar alrededor de este material solución descontaminante (hipoclorito de sodio al 10%) y finalmente verter solución descontaminante sobre el papel y dejar actuar durante por lo menos 20 minutos.

- Usando material absorbente, seco y limpio, levantar el material y arrojarlo al recipiente de desecho contaminado para su posterior eliminación.
- La superficie deberá ser enjuagada nuevamente con solución descontaminante, hipoclorito de sodio al 2%.
- Los guantes serán descartados después del procedimiento.
- Lavarse las manos con agua y jabón. Desinfectarlas con alcohol iodado.
- No se recomienda el uso de alcohol ya que este se evapora rápidamente, y además coagula los residuos orgánicos superficiales sin penetrar en ellos.

#### **Pinchazos o Lastimaduras:**

- Los pinchazos, heridas punzantes, lastimaduras con materiales contaminados deberán ser lavados minuciosamente con abundante agua y con solución de jabón cremoso durante 10 minutos; posterior antisepsia con alcohol de 70°.
- Se deberá favorecer el sangrado de la herida sin provocar traumatismos en la zona por demasiada presión.
- Posteriormente realizar cura plana.

#### **Salpicaduras de piel intacta:**

- Efectuar arrastre mecánico con abundante agua corriente, no menos de 10 minutos.

#### **Salpicaduras de mucosas:**

- Ejecutar arrastre mecánico con abundante solución fisiológica estéril, no menos de 10 minutos. Luego agregar colirio simple.
- Permitir el sangrado espontáneo de la herida o punción accidental.
- No utilizar desinfectantes sobre las mucosas (ojo, boca, nariz).
- Cubrir la herida con gasa estéril.

#### **Aerosoles:**

- El sistema de aire y las cabinas de seguridad biológicas serán dejados en ventilación.
- Personal idóneo usando ropas apropiadas podrá entrar al cuarto después de 30 minutos de ocurrido el accidente para efectuar las tareas de descontaminación.

### **CUMPLIR CON LAS SIGUIENTES PRECAUCIONES**

- Consultar inmediatamente con el servicio de guardia del establecimiento o lo que corresponda.
- Avisar del accidente al Encargado o Jefe de Sección.

- Dejar asentado en el Libro Foliado de Guardia el accidente a los efectos legales que hubiere, suministrando amplio detalle del mismo y la terapéutica instituida, como así el nombre del responsable que intervino en el procedimiento.
- El médico actuante solicitará al accidentado en forma voluntaria efectuar hepatograma, monitoreo serológico por ELISA para la detección de anticuerpos para hepatitis B, C y VIH, en caso de lesión percutánea, contacto cutáneo-mucoso o inyección parenteral de sangre o fluidos corporales provenientes de fuente desconocida, como así mismo otro/s análisis que juzgue conveniente el profesional. La extracción deberá hacerse dentro de las 24 h de producido el accidente. Repetir los análisis a los 3 y 6 meses si la primera vez fueren negativos. Droga profilaxis según criterio del infectólogo.

## RECOMENDACIONES ÚTILES PARA EL PERSONAL DEL LABORATORIO

- Se aconseja la vacunación contra el Virus de la Hepatitis B, Tétanos, Tuberculosis Difteria, Sarampión, Rubéola, Tifoidea, etc.
- Se recomienda efectuar una prueba serológica de VIH y Hepatitis B a todo el personal de laboratorio y se conservarán dichas muestras como referencia.

## VACUNACIÓN DEL PERSONAL DE SALUD

Las personas que trabajan en el sector salud están habitualmente expuestas a agentes infecciosos. La disminución del riesgo de adquirir enfermedades infectocontagiosas se basa en tres pilares:

- Lavado de manos.
- Institución rápida de medidas apropiadas en pacientes que padecen, o en los que se sospecha, enfermedades infectocontagiosas.
- Inmunización adecuada.

Para el personal que se desempeña en el laboratorio a las medidas antes mencionadas, se debe agregar:

- Cumplimiento de las normas de laboratorio (como no comer ni beber en áreas de procesamiento de muestras).
- Manejo adecuado de las muestras.
- Equipamiento adecuado para el procesamiento de muestras (ej: flujo laminar).
- Uso de equipo de protección personal (ej.: máscaras adecuadas cuando se cultiva *Mycobacterium tuberculosis*).

La inmunización debe estar incluida en las facilidades que brindan los controles de salud del personal. La prevención adecuada contra las enfermedades inmunoprevenibles es importante porque protege al personal de la adquisición de enfermedades, muchas de las cuales poseen complicaciones serias en el adulto (ej: rubeola, varicela, hepatitis B) y evita que el personal actúe como fuente de propagación de agentes infecciosos entre los pacientes, especialmente entre aquellos que poseen un riesgo mayor como los inmunocomprometidos.

### **- Políticas para la vacunación del personal de salud**

A pesar de las recomendaciones existentes, un número significativo de los miembros del equipo de salud permanece inadecuadamente inmunizado.

Las barreras más frecuentes para la vacunación del personal son el temor a los efectos adversos, el deseo de no recibir medicación y la creencia de que la vacuna no es efectiva o puede provocar una enfermedad severa.

Las intervenciones como el acercamiento de la vacuna demostraron que son efectivas, pero con niveles aún inferiores a los óptimos

### **- Guía para la vacunación del personal de salud**

Todo el personal que se desempeña en el sector salud debe estar adecuadamente inmunizado para las enfermedades inmunoprevenibles y con las vacunas recomendadas en el adulto como doble bacteriana (dT), hepatitis B, triple viral y antigripal.

En circunstancias especiales por su actividad, por ejemplo quienes se desempeñan en laboratorio de microbiología, deben recibir vacunas como BCG (bacilo de Calmette-Guerin), antirrábica, anti poliomielítica, etc.

El personal deberá ser instruido acerca de la necesidad de aplicación de vacunas, su eficacia, seguridad y los posibles efectos adversos.

Antes de administrar cualquier vacuna el trabajador de la salud deberá ser evaluado sobre la presencia de condiciones subyacentes por ejemplo embarazo, y en caso de existir alguna, deberá analizarse el riesgo frente a los beneficios de la vacunación.

La contraindicación más frecuente es el antecedente de reacción anafiláctica con dosis previas de la vacuna o alguno de sus componentes.

Los inmunocomprometidos deben ser vacunados teniendo en cuenta su condición.

**- Calendario de vacunación para el personal de salud**

En el cuadro siguiente se reseñan las vacunas recomendadas en el personal del equipo de salud, y se destacan las que deben ser administradas de rutina.

Vacuna	Dosis	Esquema	Inmunidad
Triple viral (sarampión -rubéola-paperas)	Dos	0-1 mes	Serología + (salvo paperas) o 2 dosis luego del año de vida.
Varicela	Dos	0-1 mes	Antecedente de enfermedad o vacunación previa.
Hepatitis B *	Tres	0-1-6 meses	Anticuerpos antiHBs.
Hepatitis A	Dos	0-6 a 12 meses	Serología + o vacunación previa.
Influenza *	Una	Anual	Vacunación ese año.
Doble bacteriana * (difteria-tétanos)	Tres	0-1-6 a 12 meses	Vacunación previa.

\* De rutina.

## ANEXO 1

### Revisión Conceptual: Esterilizantes, Antisépticos y Desinfectantes

- Esterilizantes: Son agentes físicos o químicos, capaces de destruir todo tipo de vida del objeto sometido a esterilización como virus, bacterias y esporas. Puede realizarse por:

- Calor húmedo a una atmósfera de presión por encima de la presión atmosférica, a 121°C durante 15 minutos.
- Calor seco a 170° durante 2 h en horno eléctrico.

- Antisépticos: son sustancias que matan o inhiben el crecimiento de microorganismos y que por ser relativamente no tóxicas, se pueden aplicar a la piel y/o las mucosas, por ejemplo: alcohol etílico al 70% en volumen.

- Desinfectantes: Son sustancias que matan la mayor parte de los microorganismos, pero no se pueden usar sobre tejidos vivos por no ser inocuos para estos (inactivación de virus y bacterias pero no de esporas). Se puede utilizar soluciones de hipoclorito de sodio.

Es posible realizar la desinfección por:

- Ebullición en recipiente adecuado durante 20 minutos. Es el método más sencillo y seguro para inactivar la mayor parte de la flora patógena, incluyendo los virus de la Hepatitis B y VIH.
- Inmersión en desinfectantes enérgicos durante 30 minutos. No es un método tan bueno en la práctica ya que los desinfectantes químicos se inactivan por la presencia de materia orgánica.

Se debe recordar que en ciertos casos, los instrumentos son sometidos a la acción de soluciones detergentes o antisépticas para diluir las sustancias orgánicas o evitar que se sequen. Dado que este paso no es una verdadera desinfección, los instrumentos no deberán ser manipulados ni reutilizados hasta tanto no se efectúe una verdadera esterilización o desinfección suficiente.

El VIH es muy lábil y es destruido por los métodos habituales de desinfección y esterilización que se aplican a los instrumentos médicos antes de su utilización. El calor es el método más eficaz para inactivar el VIH; por lo tanto la esterilización y la desinfección basadas en la acción del calor son los métodos de elección.

La acción descontaminante de los productos que liberan cloro (solución de hipoclorito de sodio (agua lavandina) se aprovecha para tratar los instrumentos inmediatamente

después de su uso y permitir, luego, su manipulación sin riesgos hasta llegar a la esterilización o desinfección adecuada.

## PROCESO DE DESCONTAMINACIÓN

El proceso de descontaminación, cualquiera sea el agente que se emplee, deberá ajustarse a rigurosas normas de control de calidad. Los descontaminantes más frecuentes y las pautas para su correcta utilización son:

### Descontaminantes físicos

- **Vapor:** El autoclavado de los materiales es el método de elección para todo material reusable.

- **Calor seco:** Este sistema es apropiado para elementos y equipos que puedan resistir una temperatura de 180°C, quedando excluidos de este procedimiento algunos materiales plásticos.

- **Ebullición:** Es el método más simple y confiable para inactivar la mayoría de los patógenos en caso de no disponer de un autoclave. Se consigue un buen nivel de desinfección de instrumentos y equipos cuando estos materiales se sumergen en agua en ebullición durante 20 a 30 minutos.

### Descontaminantes químicos

Los agentes químicos desinfectantes, bactericidas y bacteriostáticos recomendados son los siguientes:

- Hipoclorito de sodio con 0,5% de cloro activo: Se lo considera de elección debido a su gran poder inactivante frente a virus del tipo Hepatitis B y VIH.
- Cloramina al 2% (tosil cloramina sódica o cloramina T).
- Etanol al 70%.
- Alcohol isopropílico al 70%
- Iodopovidona al 2,5%
- Formaldehído al 4%
- Glutaraldehído al 2%
- Agua oxigenada al 6%

La dirección de cada laboratorio deberá establecer qué agentes esterilizantes, antisépticos y desinfectantes y en qué condiciones se usarán.



**• Hipoclorito de Sodio, agua lavandina, agua blanqueadora, agua de Javel:**

El hipoclorito de sodio (también llamado agua de lavandina, agua de javel o agua blanqueadora) ocupa normalmente un lugar fundamental en la higiene y desinfección en operaciones biomédicas.

Cuando se diluyen con agua, las soluciones de hipoclorito generan ácido hipocloroso, siendo este compuesto el verdadero principio activo de la acción biológica. Las soluciones concentradas de hipoclorito de sodio tienen un pH alcalino ( $\text{pH} = 12$ ) que favorece su conservación pero en estas condiciones es inactiva como desinfectante. La dilución con agua corriente, cuyo pH es normalmente ácido, activa a la lavandina por generación de una concentración importante de ácido hipocloroso, llegando la solución a su punto de máxima actividad desinfectante, equivalente a  $\text{pH} = 6$  a  $7$ .

Es importante destacar que el ácido hipocloroso cuando reacciona con una molécula orgánica, en cada reacción individual desaparece una molécula de ácido hipocloroso, es decir la solución se agota en su principio activo. Por ello, se debe adecuar la relación entre agente descontaminante y material contaminado y establecer una conducta para la renovación de las soluciones descontaminantes en el curso del día de trabajo en función de la calidad y cantidad del material a tratar.

Otra consideración a tener en cuenta es que la solución concentrada de lavandina es sensible a la acción de la luz y la temperatura y, agentes que actúan disminuyendo la concentración de cloro activo. Este efecto se intensifica en función del tiempo de almacenamiento del producto ya que a los 45 días de elaborada y conservada en condiciones ideales, la actividad del cloro disminuye significativamente.

*La solución concentrada deberá almacenarse en recipientes plásticos opacos a la luz y a temperaturas no mayores de  $20^{\circ}$ - $25^{\circ}\text{C}$ . Se recomienda no almacenar solución concentrada por períodos mayores de 30 días. Las soluciones de hipoclorito de sodio deberán prepararse en el día y no deberán ser usadas más allá de 48 horas de preparada. Teniendo en cuenta lo que antecede se recomienda titular la solución concentrada antes de preparar las diluciones.*

Titulación: Es la cuantificación de cloro activo en una muestra de lavandina mediante la titulación con Tiosulfato de sodio en medio acético y en presencia de ioduro de potasio. En un erlenmeyer colocar 50 mL de agua destilada, 10 mL de ácido acético al 10%, 2 gramos de ioduro de potasio y 1 mL de lavandina (muestra problema a valorar). Agregar un volumen de solución de tiosulfato de sodio 1N hasta el viraje de la solución a un color amarillo pardo. Los cálculos son los siguientes:

$$\frac{V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \cdot N_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \cdot 3,54}{V_{\text{NaClO}}} = \text{gramos de cloro activo / litro de soluc.}$$

Donde:

$V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$  : Volumen de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  gastado expresado en mililitros

$N_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$  : Normalidad del  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

3,54: Factor de corrección para  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

$V_{\text{NaClO}}$ : Volumen de  $\text{NaClO}$

Ejemplo, si para titular 2 mL de lavandina se gastaron 50 mL de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  1N, aplicando la fórmula anterior se deduce que la lavandina titulada contiene 88,5 g/L de cloro activo.

### Preparación de soluciones diluidas:

Partiendo de una solución concentrada de lavandina (determinada por titulación), se procederá a preparar las siguientes soluciones diluidas.

**a) Solución de 0,5 g de cloro activo/100 mL:** Esta solución se debe usar para superficies muy contaminadas (material de laboratorio). En el caso de partir de una solución concentrada que tenga 80 g/L de cloro activo, se necesitan 625 mL de lavandina concentrada llevados a 10 litros con agua potable. Cuando se deba descontaminar material conteniendo abundante materia orgánica, por ejemplo coágulos, será necesario asegurarse que la solución entre en contacto íntimo con el material. Dejar en contacto 30 a 60 minutos.

**b) Solución 5 g/L de cloro activo:** Usar para superficies muy contaminadas (material de laboratorio). Dejar en contacto de 30-60 minutos.

**c) Solución de 0,1 g de cloro activo/ 100 mL:** Esta solución se usa para limpieza de superficies poco contaminadas (paredes, pisos, etc.). Para preparar esta solución se necesitan 125 mL del preparado comercial diluido en 10 litros de agua potable. Nunca se debe mezclar lavandina con detergentes catiónicos o no iónicos y con compuestos ácidos porque estos compuestos combinados descomponen al hipoclorito de sodio, perdiendo así sus propiedades germicidas.

Es necesario recordar que las soluciones mencionadas son corrosivas, es decir que van a corroer al níquel, hierro y otros metales oxidables, por lo tanto estas soluciones no deben ser utilizadas para la descontaminación de los equipamientos metálicos.

### Antisépticos y Desinfectantes:

- **Alcohol Etilico:** provee la más rápida reducción microbiana de la piel (dos minutos aproximadamente), pero se evaporan con facilidad. Su óptima actividad bactericida se encuentra en la dilución que lo contiene en una proporción del 50% al 90%. Aunque los

alcoholes no tienen efecto residual persistente en la piel, varios estudios han demostrado que la aplicación del alcohol etílico al 70% V/V en las manos, reduce un 99,7% de concentración microbiana. Actúa desnaturalizando las proteínas. El alcohol etílico se utiliza en antisepsia a la concentración de 70% p/p, porque reduce más la tensión superficial de la célula bacteriana, facilitando el proceso de desnaturalización proteica, a la vez que reseca menos la piel. No debe emplearse sobre heridas porque lesiona los tejidos, favoreciendo un ulterior crecimiento bacteriano sobre ellas. El alcohol isopropílico es más tensoactivo y no precisa diluciones para mejorar su acción. A su vez, es más rubefaciente y en alguna medida facilita el sangrado de las heridas.

- **Agua oxigenada (peróxido de hidrógeno):** Se trata de un antiséptico que basa su acción en la liberación de oxígeno al entrar en contacto con las catalasas de los tejidos lesionados. Por tanto, tiene una actividad muy escasa sobre la piel intacta. El oxígeno liberado tiene una acción débil, que es más efectiva sobre la flora anaerobia. Su uso está contraindicado en cavidades corporales debido al riesgo de producir embolismos gaseosos.
- **Derivados iodados:** Durante muchos años, el yodo, empleado como tintura de yodo al 2% o alcohol iodado al 1%, ha sido el antiséptico de uso más extendido. Su acción es muy rápida (2 minutos aproximadamente). Su espectro es amplio y abarca bacterias grampositivas, gramnegativas, hongos, virus, amebas y también micobacterias y esporas aunque en menor actividad.
  - Los iodóforos son compuestos que liberan progresivamente el yodo que se encuentra unido a polivinilpirrolidona (povidona iodada 10%). Tienen la ventaja de no teñir la piel y de producir menos reacciones de hipersensibilidad. El yodo libre es el que presenta actividad antimicrobiana.
- **Formaldehído - formalina:** La formalina es un excelente descontaminante, pero su uso está limitada debido a que sus soluciones liberan vapores tóxicos e irritantes.
- **Glutaraldehído:** Es un agente descontaminante de altísima eficacia. Se usa frecuentemente para el tratamiento de materiales y equipos reutilizables y que sean sensibles al calor y al tratamiento de otros agentes químicos.

## SEÑALIZACIÓN UNIVERSAL

### MATERIAL CONTRA INCENDIO



### PROHIBICIÓN



### OBLIGACIÓN
























**ADVERTENCIA**



**SEGURIDAD**



## SÍMBOLOS UTILIZADOS EN LOS KITS DE REACTIVOS PARA DIAGNÓSTICO

	Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"		Elaborado por:
	Representante autorizado en la Comunidad Europea		Nocivo
	Uso diagnóstico "in vitro"		Corrosivo / Caústico
	Contenido suficiente para <n> ensayos		Irritante
	Fecha de caducidad		Consultar instrucciones de uso
	Límite de temperatura (conservar a)		Calibrador
	No congelar		Control
	Riesgo biológico		Control Positivo
	Volumen después de la reconstitución		Control Negativo
	Contenido		Número de catálogo
	Número de lote		

## BIBLIOGRAFÍA

- BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO: MEDIDAS IMPORTANTES PARA EL TRABAJO SEGURO. H Lara-Villegas, NV Ayala-Núñez y C Rodríguez-Padilla. Bioquímica 2008; 33: 59-70.
- SISTEMA DE TRANSPORTE PARA MUESTRAS DIAGNÓSTICAS Y SUSTANCIAS INFECCIOSAS. OJ Cerrote, R Massol y R Sisteg. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 2008; 42: 39-46.
- MANUAL DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO, 3ª Edición. Organización Mundial de la Salud (OMS). Ginebra 2005.
- TRANSPORTE DE ESPECÍMENES PARA DIAGNÓSTICO. R Terragno. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 2005; 39: 217-223.

### Sitios Webs

- [www.msal.gov.ar-personal salud.pdf](http://www.msal.gov.ar-personal%20salud.pdf)

## TRABAJO PRÁCTICO N° 1

### TOMA DE MUESTRA EN EL LABORATORIO CLÍNICO



#### OBJETIVOS

- Aplicar las normas de Bioseguridad para una adecuada toma de muestra.
- Conocer las técnicas para obtener muestras diversas que requieren los exámenes de laboratorio.

#### INTRODUCCION

La presente guía de TP aporta los conceptos básicos y fundamentales para la Toma de Muestra de los fluidos biológicos más frecuentes que se analizan en el laboratorio clínico, en el ámbito privado u hospitalario. En este contexto, la “toma de muestra” forma parte de un conjunto de acciones sistémicas del proceso pre-analítico que permiten al equipo de salud involucrado contar en esta etapa con una referencia normatizada.

La calidad en el laboratorio de Análisis Clínicos se logra a través de una identificación adecuada de los procesos y la descripción de los procedimientos a seguir. Así, para su correcta diagramación, el laboratorio debe organizarse en tres etapas: **pre-analítica, analítica y post-analítica**, que están perfectamente delimitadas y necesitan un control permanente. De esta manera es posible disminuir el porcentaje de error para lograr resultados confiables de las pruebas analíticas.

**Etapa Pre-analítica:** comprende la fase desde la preparación del paciente y toma de muestra hasta la preparación de ésta para su análisis. Actualmente, se adjudica a esta etapa una mayor contribución al número total de errores (alrededor del 70%).

**Etapa Analítica:** abarca todos los procedimientos relacionados con la medida de la magnitud que se estudia.

**Etapa Post-analítica:** incluye la elaboración del informe analítico y envío al médico solicitante. Todas estas fases presentan una gran importancia, ya que un error en cualquiera de ellas puede llegar a invalidar el informe final.

La etapa pre-analítica es clave, y de ella depende en gran medida el resultado final. Por esto es importante establecer criterios específicos para su control como:

- La correcta identificación del paciente y del médico solicitante, así como de la petición de análisis.

- La preparación del paciente. Con el propósito de reducir la variabilidad intra-individual de los parámetros a medir.
- La adecuada obtención, manipulación, transporte y conservación de la muestra para evitar su deterioro.

### **Preparación del Paciente**

El laboratorio posee procedimientos para indicar la preparación del paciente antes de la toma o recolección de muestra, y entregar instrucciones escritas para aquellas prácticas que requieran una preparación especial.

Muchas pruebas no requieren de ayuno, aunque es preferible que el paciente no ingiera alimento al menos entre 6 y 8 horas antes de la extracción de sangre, -en particular para exámenes del metabolismo lipídico y glucídico-, para así evitar una posible lipemia por quilomicrones. Este hecho es la principal causa de error, debido a la turbidez que presenta el suero o plasma interfiere en los métodos espectrofotométricos y colorimétricos.

Existen factores en la fase pre-analítica relacionados con el paciente que no se pueden modificar como sexo, raza, edad, embarazo y ciclo menstrual, mientras que otros son modificables con la correcta toma de muestra y la preparación del individuo.

Cabe considerar que las magnitudes biológicas están sometidas a *la variabilidad biológica* y la *variabilidad analítica*, responsables que los valores de un determinado parámetro sean diferentes entre diferentes individuos y que incluso en una misma persona difieran en el tiempo.

**Variabilidad Biológica (VB):** Se define VB a la variación aleatoria de la concentración de un compuesto biológico alrededor del punto de equilibrio homeostático. Esta VB puede ser intraindividual o interindividual. En la actualidad, el criterio que se recomienda para establecer los objetivos de imprecisión analítica señala que deben depender de la VB del compuesto que se mida.

Entre los factores relacionados con la toma de muestra que van a influir de manera significativa sobre los resultados, incluso pueden llegar a anularlos, se encuentran:

**1- Variabilidad biológica individual,** se distingue una variación intradía (a cualquier hora del día) o interdía (entre distintos días).

**2- Variabilidad por factores fisiológicos:**

a) *La ingesta de alimentos* puede afectar a los componentes bioquímicos del suero y al análisis de orina. Una dieta rica en fosfatos y calcio: aumenta los valores de calcio; y la rica en grasas, los de lípidos y bilirrubina.



b) *Variaciones horarias y clínicas.* En condiciones fisiológicas, las hormonas como ACTH, cortisol, tiroideas, entre otras, presentan un ritmo circadiano propio, varían su secreción a lo largo del día, e incluso en el ciclo menstrual dependiendo del día pueden provocar alteraciones en los niveles séricos de colesterol y albúmina.

c) *Actividad física.* El ejercicio moderado provoca un descenso de la concentración de la glucosa, y/o variación de la enzima creatina-fosfoquinasa (CPK) o aumento de creatinina.

d) *Drogas autorizadas,* como la cafeína, su ingesta provoca un aumento de los niveles de triglicéridos y cortisol plasmático. El consumo de alcohol induce un incremento de los niveles de glucosa. El tabaco, debido al exceso de CO, hace que se eleve el número de glóbulos rojos.

e) La *medicación* es otra fuente de interferencia. Cuando sea posible se recomienda suspender al menos 48 horas antes de la toma de muestra, previamente haber realizado la consulta al médico.

**3- Variabilidad por factores de extracción,** por ejemplo la postura en el momento de la extracción puede llevar a variaciones del 5% de los resultados, sobre todo en aumento de proteínas y colesterol, de iones como sodio (Na<sup>+</sup>) y potasio (K<sup>+</sup>) e incluso algunas hormonas, renina y angiotensina.

El tiempo excesivo de aplicación del torniquete hace que el H<sub>2</sub>O plasmática se escape de los vasos y provoque hipoxia en los tejidos, alterando algunos parámetros bioquímicos.

**4- Variabilidad debido a factores de la muestra o procesamiento,** por ejemplo una muestra de sangre hemolizada (por una mala extracción o debido a una enfermedad), sueros lipémicos, ictericos o por fármacos, etc.

## TOMA DE MUESTRA

### Generalidades

La Toma de Muestra es el acto en el que se obtiene una parte de tejido, líquido, secreción o excremento de una persona, para su estudio en un laboratorio. Cuando dicha obtención se efectúa con un método invasivo se denomina extracción.

- Al momento de la toma o recolección de la muestra, es importante realizar una correcta identificación del paciente (nombre, número de identificación, edad, sexo, número o código de la muestra, etc.) y la anamnesis del mismo previa o durante la extracción (antecedentes de enfermedades, medicamentos, entre otros).

- El personal deberá conocer y aplicar las medidas de Bioseguridad en el Laboratorio, y en particular aquellas relacionadas con la recolección y manipulación de sangre, suero, plasma y otros especímenes.

### Origen de los especímenes o muestras

Es importante diferenciar entre espécimen y muestra. Especimen es la parte del sistema biológico que se obtiene para su estudio. Muestra es la parte del espécimen que debidamente tratada se utiliza para el estudio. En algunos casos espécimen y muestra coinciden, en otros no. Ejemplo: para un hemograma el espécimen es sangre total y la muestra también, para una prueba de coagulación el espécimen es también sangre total y la muestra plasma (obtenido tras la centrifugación de la sangre total). En la literatura se pueden encontrar espécimen y muestra como sinónimos. En esta guía se usará el término *muestra*, para referirse a ambos.

Los laboratorios clínicos analizan una gran variedad de líquidos biológicos como: sangre, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR), líquido pleural, líquido ascítico, líquido sinovial, líquido amniótico y otros. Cada líquido y cada determinación requieren condiciones precisas de obtención, por lo que es fundamental establecer protocolos detallados.

Un aspecto importante del manejo de las muestras biológicas en el laboratorio es su identificación, que puede realizarse de varias formas:

- **Manual:** en las etiquetas de los recipientes de toma de muestra (tubos de vacío, jeringas, recipientes para orina, etc.), se marca el nombre del paciente y un número de acceso al laboratorio, que se escribe también en el impreso de la petición. El principal inconveniente de este sistema deriva de la transcripción manual de los contenedores secundarios que con frecuencia producen errores.
- **Etiqueta preimpresa:** el laboratorio dispone de etiquetas ya impresas con una numeración correlativa, generalmente con un código de barra. En el momento de la extracción se pega la etiqueta a cada recipiente de la muestra, y otra al impreso de petición.
- **Etiquetas impresas en el momento de la extracción:** las etiquetas se generan cuando el paciente llega al área de extracción. Puede utilizarse el sistema informático del laboratorio (Figura 1), en el que se introducen las peticiones y se generan las etiquetas necesarias para cada tubo de extracción que vaya a utilizarse.



Figura 1. Código de barras para identificar las muestras. Consta de 8 dígitos. Se interpretan de la siguiente manera: los dos primeros corresponden al día de la utilización, los dos siguientes son el mes, los 4 restantes se relacionan con el número de identificación para el laboratorio.

### Transporte y conservación de muestras

Las muestras, para ser representativas, deben mantener su composición e integridad durante las fases pre-analítica de recolección, manipulación, transporte y almacenamiento.

La estabilidad de una muestra sanguínea se define por la capacidad de mantener los valores iniciales de sus elementos dentro de límites de fluctuación aceptables durante un período de tiempo determinado. La estabilidad pre-analítica depende de varios factores, que incluyen temperatura, carga mecánica y tiempo, siendo éste el factor que causa mayor efecto. En general, los tiempos de almacenamiento de las muestras primarias, tienen en cuenta los siguientes límites para la temperatura: ambiente (18 a 25 °C); refrigeradas (4 a 8 °C); y congeladas (-20 °C).

El tiempo entre la recolección y la centrifugación de la sangre no debe exceder de una hora. Las muestras con anticoagulante (sangre total) deben ser conservadas preferentemente en frío (4 a 8 °C) hasta el procedimiento.

La muestra, una vez recolectada e identificada debe ser llevada a la zona de procesamiento. Hay diversas maneras de transportar las muestras: entre unidades de un mismo laboratorio, entre unidades diferentes en la misma ciudad o a unidades en el exterior.

Cuando los laboratorios están próximos no presenta grandes dificultades. Los recipientes que contienen las muestras (tubos o frascos) deben ser de material plástico (polietileno o polipropileno, o en su defecto material de vidrio) para Hemograma, pruebas Bioquímicas, Inmunológicas y otras, deben estar tapados con su tapón de goma, y dispuestos en gradilla. No deben envolverse los tubos/frascos con las solicitudes de exámenes, éstas deben venir en forma separada.

Toda muestra de sangre debe manipularse con guantes y transportarse en contenedores con tapa (sobres especiales o cajas), especialmente diseñados y destinados sólo para ese propósito. Jamás debe transportarse una muestra dentro de un bolsillo o en la

mano. Las muestras que necesiten congelación deberán enviarse en recipientes de poliestireno expandido con hielo seco o bolsas congeladoras.

Cuando las muestras de pacientes se envían a un laboratorio distante, las reglas de seguridad biológica deben cumplirse así como la integridad de la muestra debe ser garantizada durante todo el transporte. Se recomienda que haya documentación que especifique el plazo, las condiciones de temperatura y el patrón técnico de las muestras recolectadas o recibidas. Así mismo, es necesario establecer criterios de aceptación, rechazo o aceptación de muestras con restricciones. En los Estados Unidos, el reglamento de la *Occupational Safety & Health Administration* (OSHA) exige que una etiqueta con el símbolo BIORIESGO se fije al embalaje. El documento del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) H18-A3, *Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens; Approved Guideline, 3rd ed.- 2004*, describe los procedimientos para la manipulación y transporte de muestras de diagnóstico.

## **NORMAS GENERALES DEL TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS**

### **Los tubos con la muestra deben ser transportados:**

✚ *En el menor tiempo posible y a la temperatura adecuada.* De esta manera se evita la formación de amoníaco, glicólisis, degradación de las proteínas, y otros procesos que conducen a alteración de muchos analitos, y provocan el rechazo de la muestra, o aporte de datos erróneos.

- Hay determinaciones que se deben enviar de manera inmediata para su análisis o conservación en el laboratorio hasta su procesamiento, por ejemplo el amonio o las catecolaminas.
- Para la cuantificación de las vitaminas A y B6, beta-carotenos, porfirinas y bilirrubina debe evitarse la exposición a la luz.
- Otras necesitan refrigerarse inmediatamente después de la extracción, por ejemplo la gastrina o actividad de renina, ACTH.
- En contraste, para el análisis de las crioglobulinas o el de ácido láctico, la muestra necesita una temperatura de 37° y un transporte rápido al laboratorio.

✚ *En posición vertical* para promover la formación del coágulo y minimizar la agitación del líquido, lo cual reduce la posibilidad de hemólisis. Así, por ejemplo, no se verán afectadas enzimas hepáticas; iones (potasio, hierro, fósforo, magnesio, calcio); proteínas (proteínas totales, albúmina).

- ✚ *Tapados*. Elimina la posibilidad de contaminación exógena de la muestra, evaporación, posibilidad de derrame y la producción de aerosoles al momento de la centrifugación.

### **Factores relacionados con el rechazo de la muestra**

- Petición ilegible
- Muestra y Petición con datos no coincidentes
- Petición sin identificar con código de barras
- Muestra con volumen incorrecto
- Muestra en tubo incorrecto
- Muestra mal identificada o sin identificar
- Muestra con problema en Código de Barras

- ***Muestra con Hemólisis***

La hemólisis es la ruptura de los hematíes que libera hemoglobina y otras sustancias en el plasma y este adquiere un color entre rosa y rojo. Esto afecta a varias determinaciones por el aumento en el suero del analito a medir -por ejemplo sodio o potasio- o también por interferencia óptica o química durante la fase analítica (Figura 2).

Existen varias causas relacionadas con:

**a) La extracción sanguínea:**

- Si usa aguja demasiado fina (elegir calibre 22G, 21G, 20G)
- Si aspira demasiado fuerte durante la extracción (desplazar el émbolo suavemente).
- Si fuerza el paso de la sangre al tubo a través de la aguja (es conveniente quitar el tapón y dejar resbalar la sangre por las paredes del tubo).
- Si transvasa burbujas de la jeringa a los tubos.
- Si utiliza tubos con agua o húmedos.

**b) La manipulación en el laboratorio:**

- La muestra de sangre debe centrifugarse una vez que ha coagulado, a las revoluciones adecuadas y en aparatos bien calibrados.

**c) Con el paciente:**

- Reacción antígeno-anticuerpo, reacción postransfusional, anemia hemolítica, enfermedad hepática.

- ***Muestra coagulada***

Debido a una extracción difícil de larga duración, por no mezclar la sangre en los tubos adecuadamente o por las características del paciente.

- **Muestra con ictericia**

La presencia de bilirrubina en la sangre puede alterar algunas determinaciones pero no se considera error dado que no está relacionado con la extracción o el tratamiento de la muestra (Figura 2).

- **Muestra lipémica**

Tienen alto contenido en grasa y aspecto lechoso. Se pueden observar en pacientes que no han realizado el ayuno recomendado y con una ingesta copiosa de alimentos y en muestras contaminadas de pacientes sometidos a nutrición parenteral (Figura 2).

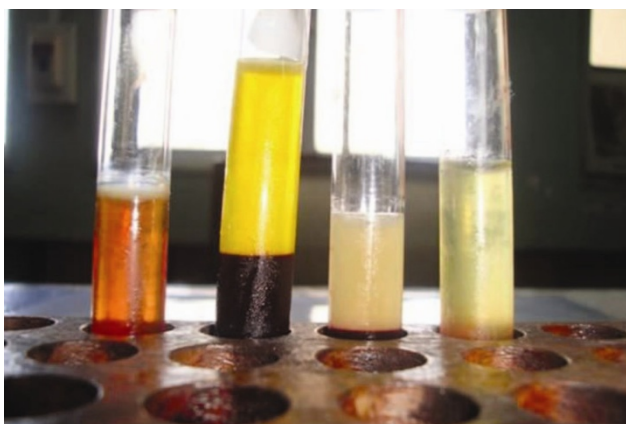


Figura 2. Variación del color del plasma: hemolizado, icterico, lipémico y normal (de izquierda a derecha). <http://www.ijpmonline.org/>

## TOMA DE MUESTRA EN HEMATOLOGÍA

La sangre venosa es la muestra hematológica por excelencia, por la riqueza de datos que aporta y su relativa facilidad para obtenerla (punción venosa, arterial y capilar).

La consulta del laboratorio para un fin diagnóstico se realiza normalmente por la mañana y las venopunciones se deben estandarizar en términos de la hora de extracción (7 y 9,30 h). Como se ha mencionado, es importante definir el protocolo de preparación de muestras, del tiempo de aplicación del torniquete, la postura durante la toma de sangre, la temperatura, de transporte y el almacenamiento.

Una vez obtenida la sangre sufre un proceso espontáneo de coagulación, entre unos 3-10 minutos después de su extracción. En una primera etapa se forma una masa semisólida de color rojo llamada *coágulo*, que está formada por una red de fibrina que engloba todas las células sanguíneas, posteriormente se contrae y libera el *suero*, un líquido que tiene una composición similar al plasma, a excepción del fibrinógeno y diversos factores de coagulación que son consumidos durante el proceso.

## Reactivos y Materiales para la recolección de muestras de sangre

### 1) Anticoagulantes

Son sustancias comúnmente utilizadas en la toma de muestra, capaces de impedir la coagulación de la sangre. En hematología es preciso saber elegir el anticoagulante idóneo y mantener siempre una adecuada proporción entre éste y el volumen de sangre extraída, asegurando que su presencia **no** altere el volumen de los glóbulos rojos, **no** produzca hemólisis, evite la agregación de las plaquetas y **no** modifique la morfología plaquetaria. Así también no debe alterar el analito a determinar.

La sangre tratada con anticoagulante debe procesarse lo antes posible, ya que se deteriora con facilidad incluso mantenida en refrigeración (4 °C).

Los anticoagulantes se suministran en forma sólida o líquida, y los más usados son:

- a) EDTA
- b) Citrato de Sodio
- c) Heparina

Los dos primeros impiden la coagulación sustrayendo el calcio del plasma sanguíneo por fijación o precipitación en forma no ionizada, mientras que la heparina neutraliza la trombina y otras fases de la activación de los factores de coagulación.

**a) EDTA:** (Ácido etilendiaminotetraacético, en forma de sal disódica). Se prepara en una concentración de 1 a 2 mg/mL de sangre. Se puede usar desecado a menos de 60 °C ya que a temperaturas mayores se descompone la sal. No afecta la realización del hemograma (determinación de hemoglobina, hematocrito y recuento de células sanguíneas). Se consiguen extendidos de sangre aceptables aún cuando hayan pasado 2 ó 3 h y hasta 24 h si la sangre es refrigerada.

**b) Citrato de Sodio:** Se emplea en forma de solución al 3,8% de Citrato trisódico dihidratado (3,1 g/100 mL de agua destilada), o si es pentahidratado (3,8 g/100 mL de agua destilada). **La proporción de citrato de sodio/sangre** depende de la prueba a determinar, para la **Eritrosedimentación** o velocidad de sedimentación globular (VSG) **es de 1:4** (por ej.; 0,5 mL de anticoagulante con 2 mL sangre) y en **Hemostasia es de 1:9**. No es satisfactorio para el recuento de leucocitos o la realización de extendidos de sangre ya que produce un fondo azul en las preparaciones teñidas con May Grunwald-Giemsa. Se utiliza en forma frecuente en transfusiones sanguíneas.

**c) Heparina:** es un anticoagulante fisiológico, que actúa sobre la cascada de coagulación evitando la transformación de protrombina en trombina. La proporción de heparina (de sodio o de litio) aconsejable es de 15-20 U (0,1-0,2 mg) de heparina /1 mL de sangre (1 mg de

heparina en polvo equivale aproximadamente a 125 U). También puede usarse desecado en paredes de tubos o capilares para extracciones en neonatos o niños y para muestras de gases en sangre.

d) Otro anticoagulante de uso menos frecuente es la mezcla de **Oxalato amónico y potásico** (solución de Wintrobe). Se utiliza para la realización del hemograma (determinación de hemoglobina, hematocrito y recuentos de células sanguíneas) en una proporción de 0,5 mL de solución/5 mL sangre por tubo/ frasquito desecado en estufa a 37°C. No se usa para el análisis de nitrógeno y potasio.

## 2) Materiales

Los materiales que se utilizan para la toma de muestra tienen que ser estériles, químicamente inertes (para evitar hemólisis), eficientes para la penetración a través de la piel y en consecuencia poco traumáticos.

- **Jeringas:** inicialmente, las jeringas empleadas eran de vidrio y se reutilizaban luego de una esterilización. En la actualidad se utilizan jeringas de plástico desechables de un solo uso. Sus tamaños más habituales son 3, 5, 10 y 15 mL.

- **Agujas:**

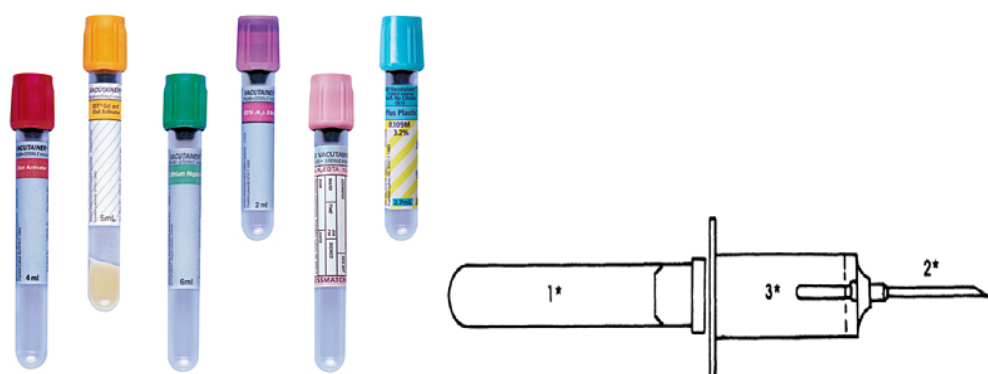
Intravenosas:	22G x 1" = 0,7 mm x 25 mm niños
	21G x 1" = 0,8 mm x 25 mm adultos
	20G x 1" = 0,9 mm x 25 mm adultos
Intramusculares:	21G x 2" = 0,8 x 50 mm
	21G x 1½" = 0,8 x 38 mm
Subcutáneas:	25G x 5/8" = 0,5 x 16 mm
	26G x ½" = 0,45 x 13 mm
	27G x ½" = 0,3 x 13 mm para insulina

- **Sistema de vacío para recolección de sangre**

Este sistema permite recoger sangre venosa directamente en los contenedores definitivos. En la figura 3 se representan los componentes de este sistema que son tres: el dispositivo de sujeción de los tubos (3), la aguja (2) y los tubos (1).

Los tubos estériles al vacío de material de plástico recubiertos interiormente de silicona para reducir la adhesión de los coágulos a las paredes y disminuir el riesgo de hemólisis). Debido a que la silicona puede descomponerse con el tiempo, se recomienda respetar la fecha de caducidad. Se llenan hasta un determinado volumen y presentan tapón con color (código de color regulado por la norma ISO 6710) que indican el tipo de anticoagulante que contiene o su uso.





Tubos de Vacío

Sistema de recolección de especímenes de sangre con tubo de vacío

Figura 3. Tubos para recolección de sangre

**Código de colores de los tapones para tubos de recolección**

COLOR DE TAPA	ANTICOAGULANTE	MUESTRA	APLICACIÓN
<b>Azul</b>	citrato de sodio (1/9)	Plasma	Estudios de coagulación (Hemostasia)
<b>Negro</b>	citrato de sodio (1/4)	Plasma	Velocidad de sedimentación globular (VSG)
<b>Lila</b>	EDTA	Sangre total / Plasma	Recuentos hematológicos (Hematología)
<b>Verde</b>	Heparina	Plasma	Química (algunas determinaciones)
<b>Rojo</b>	Sin anticoagulante	Suero	Química, Endocrinología, Serología
<b>Gris</b>	Oxalato de potasio o Fluoruro sódico	Plasma	Química (Glucosa)
<b>Rojo/Gris</b>	Gel separador inerte (sin anticoagulante)	Suero	Química, Endocrinología, Serología
<b>Amarillo</b>	Aditivo de ácido cítrico-dextrosa	Plasma	Estudios de bancos de sangre.

**PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE SANGRE**

**a) Extracción venosa**

Para la técnica de la toma de muestra venosa, se deben seguir las recomendaciones internacionales del NCCLS (*Nacional Comité for Clinical Laboratory Standards*, 1998). Se efectúa por punción de una vena anterior del brazo (cefálica, mediana cubital y basílica), a

los pacientes en condiciones basales y en ayunas. La sangre obtenida se coloca en tubo con o sin **anticoagulante líquido o desecado** (EDTA, citrato de sodio, oxalato de potasio, o heparina) dependiendo de los diferentes estudios analíticos, ya sean bioquímico, hematológico y/o microbiológico.

En el caso que se solicite un hemograma, se utiliza anticoagulante desecado para evitar la dilución de los elementos de la sangre. Es importante tener la precaución de homogeneizar suavemente la muestra de sangre para evitar la destrucción celular y obtener la completa disolución del mismo. Además, se realiza el extendido o frotis sanguíneo para el estudio de la fórmula leucocitaria con una pequeña gota de sangre desde la punta de la aguja (sin anticoagulante, ya que se puede modificar la tinción por interferencias).

### **Técnica**

1. Preparar la orden de ingreso. Identificar al paciente mediante la confirmación del nombre y número de identificación (número de historia clínica, fecha de nacimiento, etc).
2. Verificar restricción dietaria, si corresponde.
3. Preparar el material de trabajo: tubos, jeringa y aguja.
4. Tranquilizar al paciente, explicarle en forma detallada el procedimiento a realizar, hacerlo participar activamente.
5. Extender el brazo del paciente sobre un lugar cómodo para el paciente y el extraccionista, dejando expuesta la zona anterior del brazo. Se efectúa una pre-selección de las venas antecubital por grosor y superficialidad.
6. Seleccionar un sitio adecuado para la venopunción. Colocar el lazo de látex haciendo un nudo sencillo fácil de desatar, a nivel del antebrazo comprimiendo suavemente a unos 7,5-10 cm por encima del lugar de punción, para obstruir el retorno de sangre venosa al corazón y así distender las venas.
7. Indicar al paciente que cierre el puño. Palpar y seleccionar la vena, si no se puede palpar decir al paciente que cierre y abra alternativamente el puño, o golpear con los dedos la zona de elección.
8. Limpiar la piel con torunda de algodón embebida en alcohol y dejar secar al aire.
9. Introducir la aguja en un ángulo de 15° aproximadamente (entre la aguja y la piel) con el bisel de la misma hacia arriba. No debe ser un ángulo mayor porque es frecuente atravesar la vena, ya que cuando se penetra con la aguja la piel ofrece resistencia, la cual desaparece en vena y no muy paralelo al brazo porque se puede tapan el bisel. La sangre fluye a la jeringa tirando suavemente del émbolo.
10. Decir al paciente antes de finalizar la extracción de sangre que abra el puño. Con la mano que se tracciona el émbolo se desata el nudo del lazo (no debe estar más de 1 minutos), y con la otra, se sigue sosteniendo la jeringa.

11. Retirar la jeringa con la aguja y presionar con un algodón unos minutos, decir al paciente que permanezca sentado o acostado por posibles desvanecimientos y que siga sosteniendo la torunda de algodón.

12. Colocar la sangre en los tubos (descartar previamente la aguja en descartadores, nunca sacar con la mano la aguja de la jeringa) teniendo la precaución de verter por las paredes y si tuviera burbujas dentro de la jeringa no introducirlas (para prevenir hemólisis).

13. Vendar el sitio de la venopunción después de verificar que el sangrado se detuvo.

### **No se debe proceder a la toma de muestra de sangre:**

- De un área con hematoma.
- De un brazo con fístula o malformación arterio-venosa.
- Por encima de un sitio donde hay líquidos endovenosos (realizar la punción en el brazo contrario).
- Del mismo lado donde una paciente ha tenido una mastectomía.
- Para una muestra capilar no ejecutar una punción en un dedo o talón que esté magullado, herido, frío, cianótico o edematoso.

### **b) Extracción de sangre arterial**

La obtención de la muestra de sangre arterial debe ser realizada por personal capacitado. Es conveniente punzar los vasos arteriales que posean mejor circulación colateral por si ocurre espasmo o coagulación. También que sea una arteria superficial, porque es menos dolorosa y mas fácil de entrar. La **arteria radial** es la más accesible y de menos peligro (Figura 4), ya que por la arteria cubital la circulación es más completa. La arteria femoral no reúne con las condiciones antedichas y tiene complicaciones graves.

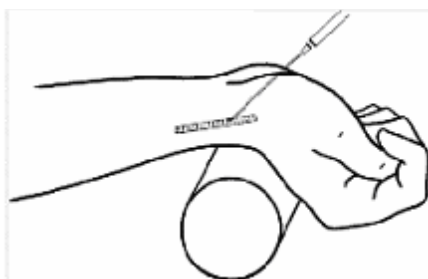


Figura 4. Extracción de sangre arterial (arteria radial)

### **Técnica**

1. Extender un poco la muñeca y palpar la arteria radial (tomar pulso).

2. Limpiar la piel con torunda de algodón embebida en alcohol, y dejar secar.
3. Introducir la aguja lo más paralela posible a la arteria (el tamaño ideal de la aguja es calibre 20 ó 21). La sangre debe fluir fácilmente dentro de la jeringa heparinizada.
4. Retirar la aguja y presionar sobre el sitio 2 minutos. Si se entra en forma oblicua la incidencia de hematoma es mínima.
5. La punción de una arteria puede ser un poco más molesta que la punción de una vena.

### **Gasometría**

Este análisis tiene como objetivo medir los valores en condiciones prefijadas de parámetros sanguíneos y gases presentes en sangre arterial. Esto ayuda a los profesionales sanitarios a valorar el estado respiratorio del paciente y el estado de los órganos reguladores del organismo como los pulmones o los riñones y el equilibrio ácido-base. Los parámetros que se miden normalmente son pH, presión de O<sub>2</sub>, presión de CO<sub>2</sub>, concentración de ión bicarbonato, saturación de O<sub>2</sub> y exceso de bases. El correcto tratamiento de la muestra y la consecución de unos resultados fiables son de suma importancia ya que los límites tolerados fisiológicamente son muy estrechos y cualquier desviación debe ser corregida de inmediato con oxigenoterapia o terapia intravenosa.

Para la determinación de gases en sangre se requiere de sangre arterial. La toma de muestra puede hacerse con jeringa de vidrio (es el material de elección) o plástico. Las jeringas de plástico tienen la ventaja de ser descartables, irrompibles, no requieren esterilización y son de menor costo. Aunque presentan los siguientes inconvenientes:

- a) El rozamiento del émbolo no permite que la presión arterial llene la jeringa con facilidad, y así se introducen burbujas de aire.
- b) La jeringa de plástico por lo general no tiene buen cierre, entonces quedan expuestas a gran cantidad de burbujitas de aire debajo del émbolo.
- c) No se desplaza con facilidad.

### **Precauciones con la muestra arterial**

Deben **anticoagularse** perfectamente con heparina sódica o de litio ya que basta una coagulación mínima para que el equipo de gases sanguíneos deje de funcionar. La heparina amoniacal, EDTA, citrato y oxalato alteran el pH. Una concentración de 1mg de heparina sódica/mL de sangre no afecta el pH. Si se carga una jeringa de vidrio de 5 ml y se vacía, el espacio muerto de la misma y la aguja contiene 0,15 a 0,20 mL de una solución al 1%, es decir lo suficiente para anticoagular 5 ml de sangre.

**Técnica anaeróbica:** Al extraer la muestra se deben eliminar inmediatamente las burbujas de aire y cubrir la aguja con un tapón de goma o tapar jeringa con tapones para tal fin.

**Enfriamiento de la muestra:** Se debe colocar la jeringa en baño de hielo o heladera para evitar que continúe la glucólisis anaeróbica por los glóbulos blancos y rojos que provoca acumulación de ácidos orgánicos con disminución del pH y aumento del CO<sub>2</sub>.

A temperatura ambiente, el pH disminuye 0,01 unidad y a 4 °C disminuye 0,001 unidad, en 20 minutos (heladera). De igual manera, aumenta 1 mmHg/10 minuto a 37 °C y a 4 °C aumenta 0,1 mmHg/10 min, la pCO<sub>2</sub> y disminuye 0,1 volumen %/10 min a 37 °C y disminuye 0,01 vol. %/10 min la pO<sub>2</sub>.

### **c) Extracción Cutánea**

Estas punciones se realizan en los recién nacidos, los pacientes pediátricos menores de 2 años, los adultos con quemaduras severas, antecedentes trombóticos (cuyas venas se reservan para fines terapéuticos) y en los pacientes geriátricos con venas frágiles.

La sangre capilar en realidad es una mezcla de sangre venosa, sangre arterial y líquido tisular. Cuando el sitio de punción está tibio, la muestra se asemeja más a la sangre arterial. Dado que las muestras capilares pueden generar resultados ligeramente diferentes, debe especificarse la obtención de la punción cutánea.

En los pacientes pueden realizarse las punciones cutáneas en el talón, el dedo gordo del pie o los dedos de la mano, la sangre debe fluir libremente sin ejercer presión para no contaminar con líquido intersticial (con alto contenido en K<sup>+</sup> por la rotura de células). En los lactantes el sitio de elección es la superficie lateral (externa) del lado plantar (inferior) del talón (Figura 5).

### **Obtención de sangre capilar en pediatría**

#### **Técnica**

1. Sumergir la extremidad inferior en agua a 40 °C por dos minutos en reloj. Controlar la temperatura del agua.
2. No desinfectar con yodo - povidona, usar alcohol de 70°.
3. No usar agujas, hojas de afeitar, ni bisturí.
4. Usar lancetas

#### **Probables complicaciones de la punción capilar**

1. Infección superficial o profunda.
2. Condritis necrotizante (lesión del cartílago y trastornos en la columna vertebral).
3. Fibrosis.
4. Calcificaciones cutáneas.

En el talón las lesiones en el calcáneo son peligrosas porque la distancia que existe entre la piel y el hueso es de 4 mm en un prematuro de 1 kg. Por lo cual se deben usar lancetas de no más de 2 mm de longitud.



Figura 5. Áreas para las muestras por punción cutánea: dedos y talón

### Muestra capilar para gases en sangre

Se hace con exclusividad en lactantes por la dificultad de punzar las arterias.

#### Técnica

1. Se calienta por lo menos 10 minutos el talón o el dedo gordo, limpiando con torunda de algodón embebida en alcohol.
2. Con punción profunda del lecho capilar dilatado mana sangre libremente y se llenan dos tubos capilares heparinizados de 75  $\mu$ L, sellando los extremos con plastilina y agitando con imán el trocito de metal colocado en su interior.

### TOMA DE MUESTRA EN HEMOSTASIA

La venopunción debe ser limpia para evitar la contaminación con los factores hísticos y se debe impedir el éxtasis venoso por la compresión prolongada del lazo. Se utilizan jeringas siliconadas o de plástico y el material de vidrio nuevo, sin ralladuras o de plástico. Una vez obtenida la muestra, se mezcla y se deja a temperatura ambiente durante 5-7 minutos y luego se centrifuga a 2500-3500 rpm durante 15 minutos. El plasma se separa por pipeteo a otro tubo de plástico dentro de los 30 minutos post-extracción. El anticoagulante usado es el citrato de sodio al 3,8%.

Si no se realiza rápidamente la determinación, la muestra se mantendrá en la heladera para evitar destrucción de factores de la cascada de coagulación. También se puede congelar a -20 °C en caso de envío retardado (mayor de 4 horas hasta 15 días como

máximo). La congelación o descongelación pueden producir la crioprecipitación de algunos factores de coagulación.

## TOMA DE MUESTRA EN QUÍMICA CLÍNICA

En general, la muestra de elección es **suero** que se obtiene recolectando la sangre en tubos de hemólisis o de centrifuga secos. Los mismos se colocan en baño de 37 °C por 10 a 30 minutos para retracción del coágulo. Luego, se centrifuga y se separa el suero para su posterior procesamiento (si el coágulo se adhiere a las paredes del tubo se debe despegar con varilla de vidrio o plástico seca). La hemólisis que ocurre por ejemplo por una mala extracción sanguínea o por trabajar con material húmedo, etc, es una causa importante de error en las determinaciones colorimétricas o espectrofotométricas. Por un lado, porque la hemoglobina liberada absorbe a una longitud de onda de 540 nm interfiriendo en las lecturas y por otro, durante la hemólisis se vierten al plasma componentes eritrocitarios como enzimas [(lactato deshidrogenasa (LDH), aspartato aminotransferasa (GOT), alanina aminotransferasa (GPT)], potasio, glucosa, fosfato inorgánico, sodio y calcio, que modifican su concentración e influyen en el resultado final.

Para la determinación de glucosa puede usarse suero o **plasma**, el cual se obtiene con anticoagulante heparina, EDTA o fluoruro de sodio (a una concentración mayor o igual a 200 mmol/L). Este último por su capacidad de inhibir las enzimas glucolíticas hemáticas, es de elección cuando el tiempo que transcurrirá entre la toma de muestra y la determinación de glucosa, sea de más de una hora.

### Estabilidad e interferencias de las pruebas bioquímicas

Hemólisis: mayor a 5 g/L de Hemoglobina.

Ictericia: mayor a 10 mg/dL de Bilirrubina.

Lipemia: mayor a 500 mg/dL de Lípidos.

### 1- DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS

El estudio del perfil lipídico de rutina incluye: colesterol, colesterol HDL (lipoproteínas de alta densidad) colesterol LDL (lipoproteínas de baja densidad) y triglicéridos.

- Indicar al paciente un ayuno de al menos 8 h antes de la toma de sangre y de una ingesta libre de alimentos grasos.
- No utilizar los contrastes yodados antes de la prueba.
- No tomar alcohol, al menos 72 h antes de la toma de muestra.

- Suspender medicamentos 3 días antes (ac. Ascórbico, ac. Nicotínico, Andrógenos, Corticoides, entre otros). Salvo que su médico le indique lo contrario.
- Evitar el éxtasis venoso que provoca hemoconcentración y la liberación de colesterol tisular.

### Conservación y transporte de la muestra

Las muestras pueden permanecer un día a temperatura ambiente de 20-25 °C, 5 días a 4°C y 3 meses congelada. El transporte de la muestra se realiza a temperatura ambiente.

## 2- ENZIMOLOGÍA CLÍNICA

Se prefiere **suero** y no plasma porque algunos anticoagulantes modifican sensiblemente la actividad enzimática.

Determinación	No interfiere	Si interfiere
Amilasa	Heparina	Oxalatos y Citrato. Valores bajos
Lipasa	estable en el suero	-
Fosfatasa Acida	congelado dura 3 meses	Heparina, fluoruros y oxalatos
Fosfatasa alcalina	congelada dura 16 meses	Fluoruros u oxalatos
Láctico deshidrogenasa	Suero	Oxalato (inhibe). Heparina, EDTA
Transaminasas	Se prefiere suero heparina, oxalato, EDTA y Citrato. GOT congelada 2 a 3 semanas y GPT congelada 1 semana.	-
Colinesterasa	Heparina Congelada dura varios meses.	El citrato, oxalato o fluoruro se combina con calcio y activa la enzima.

## TOMA DE MUESTRA EN ENDOCRINOLOGÍA

El sistema endocrino (SE) comprende el conjunto de órganos y tejidos que forman hormonas. Ambos, el sistema endocrino y el nervioso regulan casi todas las actividades metabólicas y homeostáticas del organismo, determinan el ritmo del crecimiento y desarrollo, influyen sobre muchas formas de conducta y controlan la reproducción. Un tercer sistema que media la comunicación intercelular es el sistema inmunológico, éste se halla sujeto a una modulación nerviosa y hormonal, y las citoquinas producidas por los linfocitos pueden modificar la función endocrina.



La exploración y la valoración del estado de las diferentes hormonas en los individuos, desde el nacimiento hasta la edad adulta, requieren la comparación de los resultados con rangos de referencia que correspondan con la edad, sexo y estado puberal, ya que la mayoría de las hormonas varían en función de ellos.

En el caso de las determinaciones hormonales de laboratorio, resulta crucial una adecuada toma de muestra con condiciones pre-analíticas específicas. Existen factores fisiológicos importantes que se deben considerar como:

• *Edad*, • *Estrés emocional y físico*, • *Ejercicio y cambios posturales*, • *Ritmo circadiano*, • *Variabilidad intraindividual en la secreción hormonal*, • *Secreción hormonal episódica*, • *Medicamentos* y • *Enfermedades de base*.

Para la mayoría de las determinaciones hormonales se emplea suero, y cuando se requiera plasma, orina de 24 hs, saliva (cortisol), lágrimas y sudor. Se recomienda el ayuno: en niños pequeños de 4 a 6 horas; en niños mayores y adultos de 8 h. Es importante tener presente las condiciones de preparación del paciente, recolección y tratamiento de la muestra para cada hormona en particular (por ejemplo: ACTH en tubo plástico con EDTA y empleo de centrífuga refrigerada). Tabla 1.

En la actualidad, para la valoración de hormonas y sus metabolitos, se utilizan los inmunoensayos que pueden emplear distintos tipos de sustancias marcadoras, entre ellos se encuentran: quimioluminiscencia (CLIA) y electroquimioluminiscencia (ECLIA), radioinmunoanálisis (RIA), fluoroinmunoanálisis (FIA) y enzimoimmunoanálisis (EIA). Otros métodos: químicos, espectrofotométricos, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

En numerosas determinaciones hormonales, los niveles en sangre o urinarios de hormonas basales resultan limitantes, por lo tanto, es necesario usar las pruebas de estímulo o supresión para confirmar si existe o no trastorno endocrino. Las pruebas dinámicas valoran el eje global entre hipotálamo, hipófisis y el órgano blanco, y se basan en el principio de retroalimentación (positiva o negativa). Cuando hay exceso de hormona (hiperfunción), se realiza una prueba de supresión, en contraste, cuando se evidencia una deficiencia de la hormona (hipofunción) se efectúa una prueba de estimulación, determinando la hormona respectiva.

Tabla 1. Instrucciones generales para la Toma de Muestra en Endocrinología

Determinación	Preparación del Paciente	Tipo de Muestra y Conservación
Adrenocorticotrofina (ACTH)	Reposo previo de 30 min.	Plasma con EDTA, utilizar tubos plásticos mantenidos en baño de hielo y centrifugar en frío. Congelar a -20C.

Aldosterona	Evitar tomar diuréticos, antihipertensivos y anticonceptivos orales, durante 2 a 4 semanas previas a la TM, la extracción se realiza temprano a la mañana en posición supina, antes el paciente debe haber estado recostado 30 min. Para obtener la muestra en posición supina, el paciente debe haber estado parado en movimiento por lo menos 2 h previas a la extracción.	Suero, plasma con EDTA o Heparina. Almacenar 2-8 °C hasta 24 Hs. Luego conservar congelado -20 ° C.
Aldosterona Urinaria		Orina de 24 h
AFP plus (Triple test) Free beta HCG y Estriol Libre	Screening II Trimestre del embarazo (preferentemente en la semana 16).	Suero
Androstenodiona (Delta-4) DHEA-S Estrona Plasmática (E1) Testosterona Total		Suero, plasma con EDTA o Heparina
Cortisol Libre Urinario (CLU)	Disminuir la ingestión de líquidos y evitar situación de Stress.	Orina de 24 h recolectada en recipiente de plástico sin conservantes. Medir diuresis y remitir una alícuota de 10 ml refrigerada.
Cortisol Sérico	Consignar hora de la TM.	Suero, plasma con EDTA o Heparina
Estradiol (E2)	En pacientes de sexo femenino se realiza extracción entre los días 3 y 5 del ciclo. Consignar FUM y fecha de extracción de la muestra.	Suero, plasma con EDTA o Heparina
Gastrina	Suspender la ingesta de antiácidos, drogas anticolinérgicas y antagonistas de receptor H2, previo a la toma de muestra	Suero. Inestable 2-8 °C. Congelar inmediatamente a -20°C.
Globulina Ligadora de Androgenos y Estrógenos (GLAE)		Suero
Gonadotrofina Corionica Humana (Beta-HCG)	Consignar FUM.	Suero, plasma con Heparina
Gonadotrofina Corionica Humana (free Beta-HCG)	Screening primer trimestre embarazo (preferentemente 11 o 12 semanas o bien segundo trimestre (preferentemente 16 semanas.	Suero
17-Hidroxiprogesterona	Extracción 3 y 5 día del ciclo, a la mañana de 8 y 9 h am, por la variación diurna.	Suero, plasma con EDTA
Hormona de Crecimiento (GH)	Evitar el Stress, permanecer en reposo 20 min previos.	Suero

FSH y LH	Entre los días 3 y 5 del ciclo, LH también alrededor de día 12. Consignar FUM y fecha de extracción de la muestra.	Suero, plasma con EDTA o Heparina.
Insulina	Pacientes tratados con Insulina Recombinante, los Anticuerpos pueden influir en los resultados.	Suero, plasma con EDTA o Heparina
Péptido C Plasmático		Suero, plasma con Heparina
Péptido C Urinario	Disminuir la ingesta de líquidos.	Orina de 24 h, mantener refrigerada
Progesterona (PRG)	En pacientes de sexo femenino realizar la extracción los días 21 y 23 del ciclo.	Suero, plasma con EDTA o Heparina
Prolactina (PRL)	Extraer entre la 1 y 2 hora del despertar, los días 3 y 5 del ciclo. Reposo 20 min. previos a la extracción.	Suero, plasma con EDTA o Heparina
Renina Plasmática	Extracción en posición supina, luego de haber caminado 20 min, o bien recostado por 20 min. hasta el momento inmediato anterior, entre las 8:00 y 10:00 h.	Plasma con EDTA. No refrigerar los tubos. Mantener a temperatura ambiente durante la centrifugación, pues a bajas temperaturas precipita la prorenina, dando valores falsamente aumentados. Conservar a -20°C.
Somatomedina C (IGF-1)	Extraer la muestra entre la 1 y 2 h después de despertar. Evitar el stress, se requiere reposo 20 min. previos.	Suero, plasma con EDTA.
Tirotrófina (TSH), Tiroxina (T4), Tiroxina Libre (T4L) y Triiodotironina (T3)		Suero, plasma con EDTA o Heparina.
Tirotrófina Neonatal	No se requiere ayuno, debe tomarse la muestra entre el 3 y 5 día de vida. Obtener por punción del talón.	Tarjeta neonatal (con pocillos), protegida del calor y luz directa. Conservar a 2-8°C.
Triiodotironina Libre (T3L)		Suero
Vitamina D3-25 OH.		Suero, plasma con EDTA. Conservar protegido de la luz.

Referencias. FUM: Fecha última menstruación. TM: Toma de muestra

## RECOLECCIÓN DE ORINA

La orina es uno de los fluidos resultantes del metabolismo y su análisis aporta mucha información de forma rápida y su obtención es relativamente fácil. El estudio de la orina es muy útil en el diagnóstico de la enfermedad renal y del tracto urinario, y en la detección de enfermedades metabólicas o sistémicas no relacionadas directamente con el sistema urinario. Además, al ser una biopsia líquida de los tejidos del tracto urinario aporta datos anatomopatológicos.

### Material

- Envase de plástico irrompible, de boca ancha, limpio y seco.
- Envase estéril evita el lavado inadecuado.
- Cuando es de chata o papagayo debe estar convenientemente lavado.
- Bolsas colectoras adosables.

### Técnica para orina completa

Se debe recolectar la primera micción matinal por ser más concentrada, la muestra tomada al azar puede dar resultados falsos del estado de salud del paciente (orina diluida).

Para un análisis de orina completa, el método de elección es el de chorro medio en forma limpia. La mujer debe separar los labios de la vulva en el momento de la micción dejando escapar el chorro inicial. No se requiere higiene especial ni envase estéril. En caso de lactantes o niños de corta edad y adultos que no controlan esfínteres, se dispone de colectores adosables que se fijan a los genitales, siempre evitando contaminación fecal, para uso bacteriológico no son aptos por contaminación con flora circundante de la piel.

**Conservación:** Lo ideal es que la muestra sea observada y analizada en fresco lo más rápidamente posible. En caso contrario, se debe refrigerar por la proliferación de bacterias a temperatura ambiente y por su descomposición con aumento del pH por la degradación de la urea, formación de amoníaco y la destrucción de células y cilindros. Si el pH es bajo y la densidad es mayor a 1,015 tarda en producirse el deterioro.

**Conservantes:** En general para la orina de 24 h no se usan conservantes químicos, pues pueden interferir en algunos parámetros de los análisis sistemáticos. Sin embargo muchos protocolos necesitan que se añada conservantes químicos y agentes antibacterianos y/o antimicóticos a los recipientes antes de comenzar la recolección. El fin de estos es asegurar la integridad de la muestra. Estas sustancias disminuyen la oxidación y el crecimiento bacteriano y evitan cambios en el pH manteniéndolo ácido.

Los más utilizados son el tolueno, formol, timol y ácido bórico. En ocasiones, es necesario mantener el pH de la orina por debajo de 3, para lo cual se puede utilizar ácido acético

glacial (determinar 5-hidroxiindolacético) o ácido clorhídrico (determinación de catecolaminas, metanefrina y ácido vanilmandélico).

### **Técnica para exámenes funcionales**

Las sustancias en orina se excretan en concentraciones variables durante el día, por lo tanto es necesario la recolección con un régimen horario para cuantificar de modo exacto las sustancias como creatinina, glucosa, proteínas totales, electrolitos ( $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ), hormonas y urea. En este caso se usa orina de 24 h: el paciente vacía la vejiga a las 8 h de la mañana y se recolecta toda la orina durante las 24 h, incluyendo la orina de las 8 h de la mañana siguiente, esta orina debe guardarse en la heladera durante el período de recolección, y luego remitirse inmediatamente al laboratorio. Por su dificultad en la recolección se suele pedir orina de 12 h ó 3 h, llevando los cálculos a 24 h.

## **COPROPARASITOLÓGICO**

### **Procedimiento**

Se recolecta en un frasco que contiene solución fisiológica con formol al 5% (75 mL) el equivalente a una cucharadita de materia fecal durante 6 a 7 días. Esta muestra es apta para la detección de quistes de protozoarios de huevos y larvas de helmintos y no para las formas trofozoíticas de los protozoarios porque se retraen. Para los trofozoítos se recogen 1 ó 2 cucharaditas de materia fecal en 20 ó 30 mL de solución fisiológica el 7<sup>mo</sup> día solamente.

### **Técnica de Graham**

Se usa para la búsqueda de huevos de Oxyuris y Tenia. Es el estudio microscópico del mucus anal que se realiza en forma seriada durante 7 días y que puede ser en forma simultánea a la recolección de la materia fecal. Se debe adherir a la zona marginal del ano la parte adhesiva de la cinta de celofán transparente y pegarla luego sobre un portaobjeto. Otra posibilidad es limpiando los pliegues anales con gasa estéril que se coloca en solución fisiológica con formol. Se realiza al despertarse o antes de realizar el baño.

## **TOMA DE MUESTRAS PARA EXÁMENES MICROBIOLÓGICOS**

### **UROCULTIVO**

#### **Material**

- Una pastilla nueva de jabón
- Gasas estériles
- Frasco estéril de boca ancha

## **Procedimiento**

### **1) Pacientes que controlan esfínteres**

Conviene que la orina sea la primera de la mañana, o de lo contrario tener por lo menos 3 h de retención.

**Hombre:** retraer el prepucio, lavar el órgano genital con agua y jabón y enjuagar con agua, repetir la operación otra vez. Secar con gasa estériles. Comenzar a orinar, descartar el primer chorro y recoger la segunda parte de la micción directamente dentro del frasco estéril que se destapa en ese momento, descartar también la última parte de la micción. En caso de no llevar la muestra de inmediato al laboratorio, conservar en heladera hasta 6 h.

**Mujer:** Separar los labios mayores, lavar genitales externos con agua y jabón de adelante hacia atrás y enjuagar con agua, repetir la operación otra vez, colocar tapón vaginal de algodón o gasa estéril, volver a realizar la higiene como se explicó anteriormente, secar con gasa estéril, comenzar a orinar manteniendo los labios mayores separados, descartar el primer chorro y recolectar de igual manera que en el hombre.

En las niñas no colocar tapón vaginal lavar genitales externos por tres veces siempre de adelante hacia atrás secar y recolectar orina de igual forma que se explicó.

### **2) Pacientes pediátricos, lactantes o que no controlan esfínteres**

Tratar de lograr el mayor tiempo de retención posible, lavar los genitales externos según sea varón o niña y enjuagar por lo menos tres veces, secar con gasa estéril recoger orina **AL ACECHO**.

No usar bolsitas colectoras, salvo en caso que sea imprescindible. No dejar la bolsita más de cuarenta y cinco (45) minutos en la zona. Si no sobrevino la micción en ese tiempo, volver a repetir la higiene y adaptar una bolsita nueva. No traspasar el contenido a un frasco, enviar así al laboratorio.

En caso de ser adultos se debe higienizar como a pacientes pediátricos y recogerla al acecho. No se aceptan en estos casos bolsas colectoras.

### **3) Pacientes con sonda vesical**

Se obtiene la muestra por **Punción Proximal de Sonda**. Se descartan absolutamente las muestras obtenidas de bolsas colectoras.

Pinzar la sonda, desinfectarla con alcohol etílico o solución de Yodo-Povidona, dejar secar y luego efectuar la punción a 10 centímetros del meato, enviar la orina en la jeringa, obturando la aguja con tapón de goma.

#### **4) Punción suprapúbica**

Deberá realizarla el médico, se reserva para neonatos y lactantes, y adultos en casos especiales. Es un líquido de punción y así debe rotularse, se remite de inmediato al laboratorio en jeringa obturada con tapón de goma.

#### **Transporte, Conservación y Datos a consignar**

Rotular la muestra con apellido y nombre del paciente, hora de obtención y método empleado, enviar de inmediato al laboratorio o **refrigerar no más de 6 h.**

### **EXUDADO DE FAUCES**

#### **Material**

- Hisopos estériles
- Baja lengua
- Tubo con medio de transporte Stuart (si no se remite de inmediato al laboratorio).

#### **Procedimiento**

Con un hisopo estéril raspar lesiones, exudados u seudomembranas visibles en fauces, si no las hubiera hisopar ambas amígdalas o ambos pilares. No tocar la boca, dientes o lengua.

#### **Transporte y Conservación**

Enviar de inmediato al laboratorio o bien introducir en medio de transporte hasta su envío. Anotar si hay exudado purulento, seudomembranas o lesiones. Cuando se solicita una prueba rápida para detección de Streptococcus beta hemolítico del grupo "A" se debe realizar otro hisopado y enviar en tubo seco estéril.

### **EXUDADO ÓTICO, NASAL y CONJUNTIVAL**

#### **Material**

- Hisopos estériles
- Solución fisiológica estéril
- Tubo con medio de transporte de Stuart

#### **Procedimiento**

Hisopar la zona en cuestión tratando de no contaminar la punta del hisopo con zonas adyacentes. Añadir al hisopo 0,5 ml de solución fisiológica estéril, si se envía de inmediato al

laboratorio, de lo contrario remitir en medio de transporte (los exudados conjuntivales de neonatos siempre deben remitirse en medio de transporte Stuart).

## **MATERIALES DE HERIDAS**

### **Material**

- Hisopos estériles
- Jeringas y agujas estériles.
- Tubos estériles para el transporte de líquidos de punción
- Solución Fisiológica estéril
- Transporte anaerobio TAB para investigación de anaerobios

### **Procedimiento**

#### **1) POR HISOPADO**

Juntar con un hisopo estéril el exudado o material purulento, evitando el contacto con piel y mucosas, si hubiera secreción adherida, efectuar primero limpieza con solución fisiológica y gasas estériles o con hisopo para desechar.

### **Transporte y Conservación**

Conservar la muestra con 0,5 ml de solución fisiológica si se remite de inmediato, en caso contrario introducir el hisopo en medio de transporte Stuart.

#### **2) POR PUNCIÓN – ASPIRACIÓN**

Efectuar antisepsia de la zona. Con jeringa y aguja estériles, se punza el borde de la herida, si de este modo no se recoge material, se repetirá la operación inoculando 0.5 ml de solución fisiológica estéril y luego se aspirará, si se solicita investigación de anaerobios inocular un medio de transporte TAB o bien remitir la jeringa con el material y la aguja obturada con tapón de goma, previa evacuación del aire.

### **Transporte y Conservación**

Enviar de inmediato al laboratorio, o bien mantener a temperatura ambiente hasta el envío, no más de seis (6) h, anotar tipo de herida, tipo de exudado, si hay olor fétido.

## **PUNTAS DE CATÉTERES**

### **Material**

- Tubos estériles secos, frascos de hemocultivos
- Gasas estériles
- Solución de yodo – povidona o alcohol yodado
- Pinzas y tijeras estériles



## Procedimiento

Con la gasa estériles embebidas en el desinfectante, desinfectar suavemente, sin frotar la piel alrededor del catéter a retirar, dejar secar, retirar con la pinza estéril.

- 1) En casos de catéteres largos enviar dos segmentos: Interfase: se obtiene cortando con tijera estéril inmediatamente por debajo de la zona de inserción y la Punta de catéter: que es la porción distal intraluminal, en cada caso se remiten separadamente en tubos secos y rotulados adecuadamente.
- 2) En caso de catéteres cortos se envía de igual modo la punta del catéter en tubo estéril seco.
- 3) Antes de retirar el catéter, se debe obtener una muestra de hemocultivo (de esta manera si fuera positivo el cultivo del catéter debería dar positivo el hemocultivo para el mismo germen para que sea considerado responsable del síndrome febril).

## HEMOCULTIVO

### Material

- Jeringas y agujas estériles
- Guantes estériles
- Alcohol yodado o solución de yodo-povidona
- Alcohol al 70 %
- Gasas estériles grandes y chicas
- Frascos de hemocultivo provistos por el laboratorio

### Procedimiento

- Preparar agujas y jeringas nuevas cuidando que la aguja tenga el correspondiente capuchón. Elegir la vena de punción, nunca debe hacerse punción de catéteres, salvo en casos especiales que el médico indique, donde habrá de anotarse la circunstancia en el rótulo del frasco respectivo.
- Se procede a desinfectar la piel de la zona de punción con alcohol yodado o solución de yodo – povidona, se deja actuar por 2 minutos y se elimina con alcohol al 70%. Luego, no se realizan más palpaciones de la vena.
- Colocarse los guantes y desinfectar los tapones de goma de los frascos con medio de cultivo a inocular.
- Extraer sangre por punción venosa guardando **relación del 10%** con respecto a la cantidad de medio de cultivo. Para frascos de 50 cc de medio de cultivo (pediátricos) se extraerán de 2 a 5 mL de sangre, y de 10 a 20 mL en el caso de frascos de 100 cc (adultos). No se debe agregar más de esta cantidad ya que el anticoagulante PSS (polianetol sulfonato de sodio) que posee el medio de cultivo no cumpliría su acción, pero **a mayor cantidad de sangre se aumenta la sensibilidad del método**. Se deben sacar 3 muestras,

lo que permite **aumentar también la especificidad del método** por si se produjera contaminación en la extracción, siendo el intervalo de tiempo de 30 a 60 minutos entre una toma y la otra.

- Cuando se trata de una urgencia se debe realizar en cualquier momento. En relación con el pico febril, ya que muchas veces son impredecibles y frecuentemente es necesario el tratamiento antibiótico empírico de inmediato. Lo ideal es extraer la muestra media hora antes del pico febril, ya que en ese momento está circulando la mayor concentración de microorganismos.

- Inocular los frascos sin introducir aire, ni producir espuma y mezclar suavemente luego de haber extraído la aguja, manejar con cuidado estas, sin capuchón para evitar pinchazos.

### **Transporte y Conservación**

Enviar los frascos de inmediato al laboratorio, si es posible mantener a temperatura ambiente (o incubar a 37 °C). Nunca dejar en la heladera ni en recipientes con hielo. Rotular con datos del paciente, número que corresponde la muestra, hora y fecha.

## **COPROCULTIVO**

### **Material**

- Hisopos estériles
- Tubos con medio de transporte Stuart
- Frascos estériles para heces líquidas

### **Procedimiento**

Recoger con el hisopo una pequeña porción de materia fecal, preferentemente material mucoso o sanguinolento, introduciendo en el tubo con medio de transporte. No sirve el hisopado anal por contaminantes de piel.

### **Conservación y Transporte**

Mantener a temperatura ambiente y en lo posible enviar de inmediato al laboratorio.

## **EXUDADO VAGINAL Y ENDOCERVICAL**

### **Material**

- Espéculo estéril, sin usar lubricante
- Hisopos estériles

- Portaobjetos (dos)
- Guantes estériles
- Tubo con medio de transporte

### **Procedimiento**

Introducir el espéculo (cuando las circunstancias lo permitan) efectuando una rotación de 90 grados con respecto a la posición vertical original, abrirlo de manera de poder observar el cuello uterino.

Con un hisopo tomar material del fondo del saco vaginal, añadir al tubo unas gotas de solución fisiológica estéril y rotular como fondo de saco. Con otro hisopo tomar muestra de endocervix y efectuar 2 extendidos en los portaobjetos y desechar el hisopo. Con otro hisopo estéril se obtiene material de endocervix para cultivo, introduciendo en el canal cervical y dejando unos segundos, rotar para obtener secreción y mucus, luego introducir el hisopo en el tubo con medio de transporte, rotular como endocervix.

Observar la presencia de lesiones en labios, vulva, cuello uterino, etc. de éstas se hacen extendidos en portaobjetos y se rotula convenientemente.

### **Transporte y Conservación**

Enviar al laboratorio de inmediato o bien mantener a temperatura ambiente, no más de 2 h, no refrigerar. Anotar apellido y nombre de la paciente, motivo del examen y fecha de la última menstruación.

IMPORTANTE: Salvo en casos de urgencia, se aconseja efectuar el examen en la mitad del ciclo, no debe haber tratamiento en los días previos ni relaciones sexuales el día anterior. Para efectuar la investigación de *Chlamydia trachomatis* y/o Micoplasma, es necesario el medio de transporte especial para tal fin.

## **EXUDADO URETRAL**

### **Material**

- Dos hisopos estériles
- Dos portaobjetos limpios
- Tubo con medio de transporte Stuart

### **Procedimiento**

- Tomar con un hisopo secreción uretral y efectuar 2 extendidos en los portaobjetos y desechar el hisopo. Un segundo hisopo, se introduce en la uretra, se deja unos segundos

para obtener la mayor cantidad de secreción posible y luego depositar el hisopo en el medio de transporte.

- Observar si hay lesiones en el glande o en el surco balano-prepucial (si las hubiera) y hacer extendidos de las lesiones con otro hisopo en portaobjetos limpios y rotular.

### **Transporte y Conservación**

Remitir de inmediato al laboratorio tubos y extendidos (que se dejan secar al aire antes de apilar), o bien mantener a temperatura ambiente no más de 2 h, anotar apellido y nombre del paciente, edad, motivo del examen, contacto sexual sospechoso y el tiempo de transcurrido el mismo.

IMPORTANTE: el paciente no deberá estar en tratamiento local con cremas, si al hacer la toma de la muestra se notara suciedad, lavar primero el miembro con solución fisiológica y gasas estériles antes de proceder como se indicó.

## **PRIMER CHORRO MICCIONAL**

### **Material**

- Frasco estéril
- Una pastilla nueva de jabón
- Gasas estériles

### **Procedimiento**

Se efectúa la higiene de manera cuidadosa igual que para el urocultivo. Se recolecta la primera porción miccional, no más de 10 cc en el frasco estéril. Remitir de inmediato al laboratorio, no refrigerar.

## **ESPUTO**

### **Material**

- Frasco estéril de boca ancha.

### **Procedimiento**

Enjuagar la boca con solución de bicarbonato de sodio, obtener de preferencia el primer esputo de la mañana, por expectoración profunda, evitando la contaminación con saliva.

Recoger en frasco estéril tratando de no tenerlo destapado por mucho tiempo, si el paciente no tuviera tos productiva, el esputo puede ser inducido por nebulización. Obtenida la

muestra debe ser enviada de inmediato al laboratorio. No se debe juntar esputos por tiempo prolongados. Cuando se solicita seriado se deben obtener por tres días consecutivos.

### **Transporte y Conservación**

Rotular con el nombre y apellido del paciente, número de muestra en caso de esputo seriado, tipo de estudio solicitado, enviar de inmediato al laboratorio o bien refrigerar por no más de 6 h.

### **LAVADO BRONQUIAL – BRONQUIOALVEOLAR**

Se obtiene por broncoscopía y se colecta en frascos estériles provistos por laboratorio y rotulados.

**Transporte y conservación:** idem a esputo.

### **CEPILLADO BRONQUIAL – CEPILLO ENVAINADO**

Se obtiene por técnica cuidadosa, con el fin de no contaminar el cepillo con la colonización de las vías aéreas normalmente colonizadas. Se coloca en tubo estéril con 1 cc de solución fisiológica estéril, se envía sin la vaina protectora, cuidando de no volcar. Se remite de inmediato al laboratorio.

## **EXAMENES MICOLOGICOS DE LESIONES DÉRMICAS**

### **Material**

- Hoja de bisturí estéril
- Placa de petri estéril para lesiones descamativas.
- Hisopo y solución fisiológica estéril para lesiones exudativas.

### **Procedimiento**

Raspar las lesiones descamativas con hoja de bisturí, juntando la mayor cantidad posible de escamas en la placa de petri o en portaobjetos pasados por alcohol y flameados. En caso de lesiones con supuración, juntar la secreción con hisopo añadiendo unas gotas de solución fisiológica estéril.

## OTROS FLUIDOS CORPORALES

### LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

Las punciones lumbares (PL) se efectúan para recolectar el líquido cefalorraquídeo (LCR), donde se puede analizar y establecer un diagnóstico de infección (bacteriana, por hongos, micobacterias o meningitis amébrica), malignidad, esclerosis múltiple o trastornos de desmielinización y hemorragia subaracnoidea.

La muestra de LCR debe ser obtenida por un médico entrenado en la técnica de punción lumbar. Antes de comenzar la extracción de LCR debe medirse la presión en un manómetro, que debe estar entre 90 y 180 mmHg. En general se extraen varios mililitros en tres alícuotas. Si es mayor a 180 mmHg no se recomienda la punción.

#### Procedimiento

1. Lavar la región lumbar del paciente con agua y jabón.
2. Realizar antisepsia de la piel (uso de antisépticos y desinfectantes), mediante la realización de movimientos concéntricos que van desde el lugar donde se realiza la punción hacia fuera. Esperar tiempo de latencia del antiséptico.
3. Proceder a la punción lumbar con técnica aséptica.
4. Recolectar el LCR en tres frascos estériles. Utilizar el segundo frasco para el estudio microbiológico ya que el primero tiene más posibilidades de contaminación.
5. La cantidad de LCR afecta directamente la sensibilidad del diagnóstico bacteriológico. En general, son adecuadas cantidades de 1-3 mL de LCR para estudio bacteriológico.

#### Transporte y Conservación

Se debe realizar a la mayor brevedad posible, en tubos estériles con tapa rosca y/o frasco estéril, ya que la mayoría de los microorganismos causantes de meningitis son sensibles a los cambios de temperatura y desecación.

### LÍQUIDO DE CAVIDADES SEROSAS

El líquido pleural, peritoneal, pericárdico y sinovial son normalmente estériles. En procesos infecciosos aumenta su volumen y dan lugar al desarrollo de diversos microorganismos.

#### Toma de muestra

Estas muestras se obtienen generalmente por punción percutánea, por lo tanto, se debe realizar una rigurosa limpieza de la piel y antisepsia de la zona que se va a puncionar,

para evitar la contaminación de la muestra con flora cutánea y minimizar el riesgo de infección del paciente asociado al procedimiento. La muestra debe ser obtenida por un médico experimentado en la técnica y un asistente, ambos vestidos con ropa estéril, guantes y mascarilla. Las muestras deben ser conducidas a la mayor brevedad posible al laboratorio, a temperatura ambiente, en frasco estéril.

## ACTIVIDAD PRÁCTICA

Al finalizar la práctica el alumno será capaz de:

- Realizar el procedimiento correcto para la extracción de sangre, sin riesgo personal y sin dañar a su compañero.
- Separar suero y plasma.
- Proceder a la manipulación, transporte y conservación de muestras.

### 1- EXTRACCIÓN SANGUÍNEA

#### MATERIALES

- Jeringas (10 mL) y agujas estériles (21G, calibre 8)
- Banda elástica
- Tubos sin anticoagulante
- Tubos con anticoagulante EDTA
- Gradilla.
- Pipetas de 10-100  $\mu$ L y 200-1000  $\mu$ L y puntas.
- Contenedor para material cortante.
- Centrífuga
- Algodón
- Apósitos

#### REACTIVOS

- Etanol 70%
- Solución fisiológica

#### PROCEDIMIENTO

Se seguirán las instrucciones descritas en la guía sobre extracción de sangre venosa. Este procedimiento estará bajo la supervisión del Docente Responsable del TP.

### 2- OBTENCIÓN DEL PLASMA

El tubo que contiene sangre más anticoagulante se debe centrifugar a 2.000 rpm durante 10 minutos. El plasma que es la capa más externa se extrae empleando una pipeta Pasteur y se transfiere a un tubo estéril y se conserva a 4°C ó -20°C.



### 3- SEPARACIÓN DEL SUERO

La sangre obtenida se transfiere a un tubo y se deja a temperatura ambiente (20-25°C) por un mínimo de 15 minutos hasta que coagule. La retracción del coágulo se produce más rápido si se incuba el tubo a 37° C durante 30 minutos. Una vez obtenido el coágulo se centrifuga a 2.500-3.000 rpm durante 10 minutos.

Normalmente por cada 1 cc de sangre entera se pueden obtener 0,3 cc de suero. La separación del coágulo es perfecta si se emplean tubos de vidrio o de poliestireno tratados.

Observación: Los pacientes portadores de coagulopatías o sometidos a tratamientos con anticoagulantes precisan de un tiempo mayor de retracción del coágulo para esta etapa de la fase pre-analítica.

#### LO QUE NUNCA SE DEBE HACER:

- *Centrifugar la sangre antes de que se complete la coagulación, en estas situaciones se formarán cadenas de fibrina que retendrán en su arquitectura, enzimas (GOT, GPT, lipasa), sustratos (calcio, fósforo, colesterol), iones (sodio, potasio, cloro), proteínas (anticuerpos, globulinas), hormonas y metabolitos y, los resultados obtenidos de estos sueros siempre serán menores -y por consiguiente inexactos- respecto a los sueros normalmente procesados.*

- *Colocar los tubos con sangre sin anticoagulantes inmediatamente a la temperatura de 4° C ya que tampoco se obtendrá la retracción del coágulo.*

#### Cuestionario

- 1- Se cuenta con varias solicitudes de estudios de laboratorios. Señalar en cada caso qué indicación/es le daría a un paciente para obtener una muestra adecuada. JSR
- 2- ¿Qué ventajas tiene el plasma sobre el suero?
- 3- ¿Cuáles son las desventajas del plasma sobre el suero?
- 4- ¿Qué orden de tubos recomienda en la extracción de muestras múltiples? JSR
  - a) Tubos de Coagulación      b) Botella Hemocultivo      c) Tubos con EDTA K3
  - d) Tubos con heparina      e) Tubos de suero      f) Tubos de glucosa

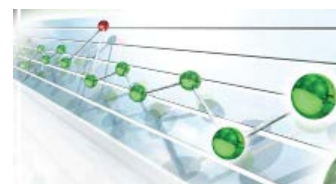
**Nota:** Seguir siempre el protocolo de su laboratorio para determinar el orden de llenado de los tubos.

## BIBLIOGRAFÍA

- HEMATOLOGÍA. FUNDAMENTOS Y APLICACIONES CLÍNICAS. BF Rodak, A George, GA Fritsma y EM Keohane. 4ª Edición. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires 2014.
- GREENSPAN. ENDOCRINOLOGÍA BÁSICA Y CLÍNICA. GD Gardner y D Shoback. 9ª Edición. Ed. McGraw-Hill-Lange, España 2012.
- EL LABORATORIO EN EL DIAGNOSTICO CLINICO. JB HENRY. 20ª Edición. Ed. Marbán, España 2010.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI/ NCCLS)-Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens; Approved Guideline. Wayne PA - 3ª Edition. CLSI/NCCLS document H18-A3. USA: NCCLS. USA 2004.

## TRABAJO PRÁCTICO N° 2

### CONTROL DE CALIDAD EN EL LABORATORIO CLÍNICO



#### OBJETIVOS

- Conocer los métodos y procedimientos para el control de calidad interno de las diferentes fases del trabajo en el laboratorio clínico.
- Aplicar las herramientas estadísticas para prevenir errores o eliminar las causas de defectos en los análisis de rutina.
- Analizar e interpretar los resultados obtenidos de los cálculos estadísticos, gráficas e informes del control de calidad, de acuerdo a reglas específicas.

#### INTRODUCCIÓN

El Laboratorio Clínico resulta indispensable a la asistencia médica, ya que los exámenes de laboratorio permiten: a) Ayudar a confirmar o descartar un diagnóstico, b) Establecer un pronóstico, c) Controlar la evolución de la enfermedad y los resultados del tratamiento, d) Detectar complicaciones, e) Colaborar en los estudios epidemiológicos y de grupos de riesgo y, f) Constituir una parte esencial de los protocolos de investigación científica y de los ensayos clínicos para la introducción de nuevos medicamentos.

Por ello, todo aquel que posee, dirige o trabaja en un laboratorio debe tener como meta garantizar la calidad mediante un Sistema Integral de Calidad.

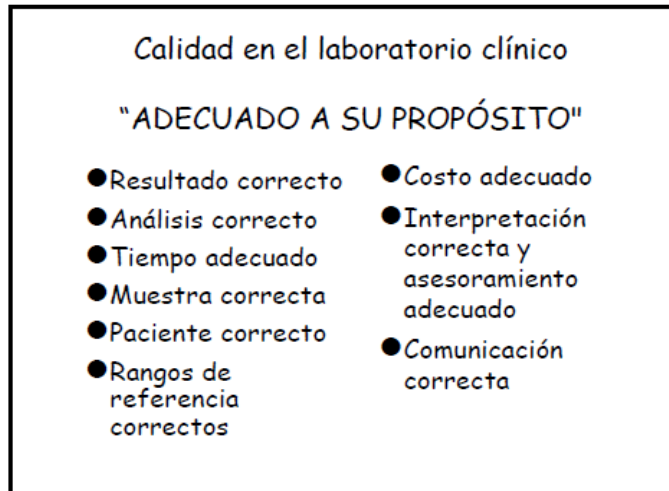
La Organización Internacional de Estandarización (ISO: *International Organization for Standardization*), define a la **Calidad** como el conjunto de características de un elemento que le confieren la aptitud para satisfacer necesidades expresas e implícitas.

El Control de Calidad (CC) en el Laboratorio Clínico es un sistema diseñado para incrementar la probabilidad de que cada resultado obtenido sea válido tanto en lo analítico como en lo clínico, y pueda ser utilizado con confianza por el médico para tomar una decisión diagnóstica o terapéutica.

#### ¿Cuáles son los objetivos del CC?

- **A corto plazo:** decidir si un resultado y/o un ensayo se puede aceptar o rechazar.
- **A mediano plazo:** identificar los factores causantes del error para implementar los ajustes necesarios que permitan eliminar las interferencias.

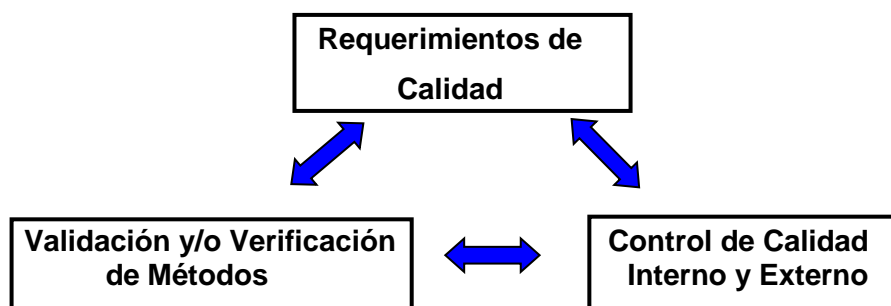
- **A largo plazo:** optimizar el ensayo por medio de cambios introducidos en la calidad de sus reactivos, calibración del instrumental, metodología, capacitación del laboratorista, etc.



La medición de un analito de interés clínico en un fluido biológico humano involucra tres fases fundamentales: **Pre-analítica, Analítica y Post-analítica**. Estas etapas cuentan con organigramas propios y ejecutan protocolos de funcionamiento definidos a través de procedimientos escritos referidos con aspectos operativos y de control.

El CC en la etapa pre-analítica está dirigido a la obtención de una muestra apta y confiable, mediante la mejora continua de las fuentes de variabilidad pre-analítica y variabilidad biológica intraindividuo. El CC en la etapa post-analítica consiste en la validación del resultado hallado y su correlación con los datos disponibles del paciente (remitirse a la guía de Toma de Muestra).

En particular, la etapa analítica comprende el proceso de medición del analito a través de la aplicación de un método. La seguridad analítica de un método está sujeta a tres aspectos relacionados entre sí:



## TIPOS DE ERRORES ANALÍTICOS

Mediante la garantía de calidad se pretende detectar el error analítico. El valor real de una muestra sólo es un concepto teórico. En la práctica, se puede alcanzar el valor más probable a partir de la realización de sucesivas mediciones y el cálculo del valor promedio. El error representa la diferencia entre el valor considerado como verdadero y el valor hallado (Figura 1), y posee dos componentes: **Errores Casuales o Aleatorios y Errores Sistemáticos**.

En general, los Requerimientos de Calidad determinan la magnitud aceptable que debe tener la medición de un analito referido con la imprecisión o error aleatorio (desviación estándar, **S**) y el **Bias** o error sistemático (ES, también sinónimo de Veracidad), así como la combinación de ambos errores analíticos o Error total (ET). (Figura 1).

El Error Total responde a la siguiente ecuación: **ET= 1,65 (CV%) + %ES** (en donde 1,65 es el factor para un nivel de probabilidad del 95%).

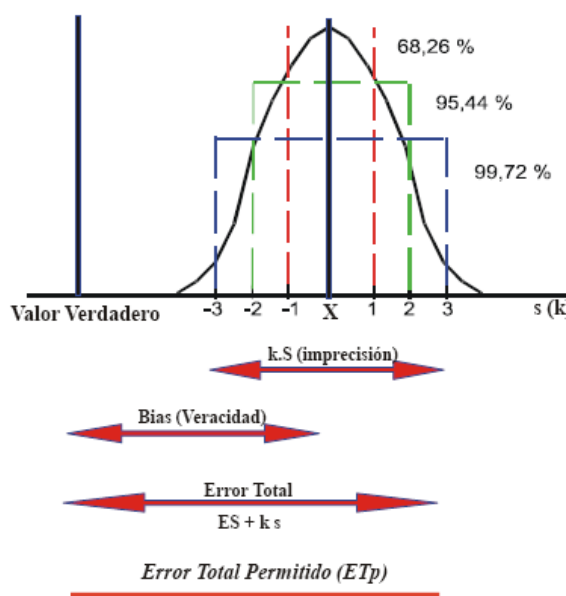


Figura 1. Distribución normal de frecuencias (Gauss). Representación del Error Total basado en la combinación de la imprecisión y la desviación (Bias) de un método.

### 1) Errores Aleatorios

Los errores aleatorios son impredecibles e inherentes a toda medición. Varían en tamaño y signo cada vez que medimos y se deben a causas irregulares y son mayores o menores, por exceso o por defecto, obedeciendo a las leyes del azar. La dispersión de los datos obtenidos en torno a su media aritmética se evalúa mediante el cálculo de la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV) (curva de Gauss, Figura 1).

### Definiciones

- **Precisión:** Grado de coincidencia entre resultados de mediciones independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas.
- **Imprecisión:** Dispersión de resultados independientes de mediciones obtenidas bajo condiciones especificadas.

La **imprecisión** de un procedimiento da lugar a la existencia de errores aleatorios y las causas son diversas como: fluctuaciones de la temperatura y energía eléctrica, variación entre técnicos, material mal lavado, agitación incorrecta, evaporación de muestras o calibrador, etc.

El error aleatorio de un resultado no puede compensarse mediante una corrección, pero logra reducirse aumentando el número de medidas. La Imprecisión se puede estudiar con mediciones de una misma muestra, repetidas en la misma serie (imprecisión intraserie) o en distintas series (imprecisión interserie).

### CONCEPTOS UNIDOS A LA IMPRECISIÓN

- **Repetibilidad:** un método es repetitivo cuando da el mismo valor específico para una muestra al repetir el análisis manteniendo las mismas condiciones de medición (lote de reactivos, técnico e instrumentos).
- **Reproducibilidad:** un método es reproducible cuando es capaz de dar el mismo resultado para una muestra al repetirse ésta en diferentes días, por distintos operadores y empleando diferentes lotes de reactivos.

*La precisión de un resultado es su reproducibilidad, pero esta además requiere de repetibilidad.*

### EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE LA PRECISIÓN DE LAS MEDICIONES

- **DESVIACIÓN ESTÁNDAR (S):** es el promedio de desviación o diferencias de cada uno de los valores con respecto a la media ( $\bar{x}$ ). Cuanto mayor es la dispersión de los datos alrededor de la media, mayor es la S.

Valor Promedio

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

n = número de muestras  
 $X$  = valor de la muestra  
 $\bar{X}$  = promedio de las muestras

Desviación Estándar

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

La **S** se utiliza para establecer los límites entre los cuales un valor puede definirse como aceptable. Los valores correspondientes a  $\bar{X} \pm 2 S$  se denominan, en términos estadísticos “límites de confianza” del resultado, y son los límites de concentración entre los cuales existe un 95,5% de que se halle la concentración “verdadera” de la sustancia a analizar en la muestra.

- COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV%): es el cociente entre la desviación estándar y la media. Representa una medida relativa de la variabilidad de dos o más conjuntos de datos, y es independiente de la unidad de medición. Es útil cuando se desea saber si los resultados de una determinación son más variables que los de otra, o comparar los datos obtenidos por diferentes operadores que están investigando la misma variable.

$$CV = \frac{s \cdot 100}{\bar{X}} \%$$

- VARIANZA: este parámetro también se relaciona con la distribución de los datos y se calcula elevando al cuadrado la S. Ya que la S puede ser positiva o negativa, al calcular su cuadrado se elimina el problema de los signos.

## 2) Errores Sistemáticos / Desviación (Sesgo, Bias %):

Los errores sistemáticos (ES) se deben a una misma causa que se repite siempre de igual manera, usualmente fácil de identificar, e influyen en el resultado siempre en el mismo sentido, afectando la veracidad del resultado. Las causas asociadas a ES podrían vincularse con: cambios de lotes de reactivos, calibración incorrecta de equipos y pipetas, reactivos mal preparados, interferentes, etc (Figura 2).

El ES proviene de las diferencias de un método analítico con el "método de referencia", así como de las diferencias producidas en el sistema analítico del laboratorio (instrumento, reactivos, calibradores, etc.) con respecto a otros laboratorios que utilizan el mismo método. El ES se calcula mediante la diferencia entre el *valor real* de un material control, y el *valor obtenido* en el laboratorio para dicho control. El valor real sería el obtenido al analizar el material control utilizando materiales y métodos de referencia, y dado que éstos no se encuentran habitualmente en los laboratorios clínicos, se usa en su defecto el llamado **valor diana** (VD) que es la media aritmética del valor obtenido por un grupo de laboratorios que utilizan el mismo método analítico.

$$ES = \frac{(\bar{X} - VD)}{VD} * 100$$

- Exactitud: Es el grado de concordancia entre el resultado de una medida y el valor verdadero (Figura 3). Depende del aporte del grado de precisión y de la magnitud de la desviación. Un resultado exacto es preciso y no desviado. La *inexactitud* es el grado en el que un valor se aleja del valor verdadero.

$$\text{Exactitud: } \sqrt{(\text{B}\%)^2 + (\text{CV}\%)^2}$$

Se distinguen dos tipos de error sistemático (ES): si el error es bajo o alto en la misma cantidad, independientemente de la concentración, se designa como ES constante (ESC) mientras que si el error es bajo o alto en una cantidad proporcional a la concentración del compuesto analizado, se conoce como ES proporcional (ESP).

Los factores que contribuyen al ESC son independientes de la concentración del compuesto analizado, y la magnitud del error es constante a través de todo el intervalo de la concentración de dicho compuesto. El ESC es causado por interferentes presentes en las muestras o los reactivos, provocando una señal falsa. Las sustancias interferentes también pueden afectar la reacción entre el compuesto analizado y los reactivos, como sucede en los métodos enzimáticos que usan reacciones acopladas oxidasa-peroxidasa, en las cuales el peróxido de hidrógeno formado es destruido por agentes reductores endógenos, como el ácido ascórbico. Asimismo, los interferentes pueden inhibir o destruir el reactivo de modo que queda en cantidad mayor para reaccionar con el compuesto analizado.

La causa más frecuente de ESP 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 ESP 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.



Cómo se observan gráficamente Precisión y Desviación?

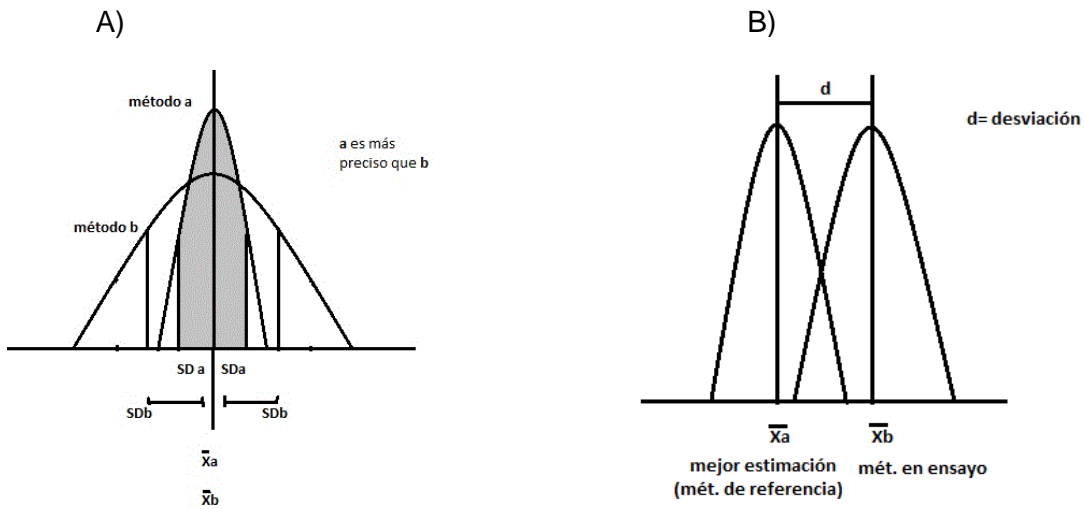


Figura 2. **A)** Distribución de frecuencia con igual valor medio ( $\bar{X}$ ) al comparar dos métodos de medición. **B)** Desviación entre dos métodos. SD: Desviación estándar.

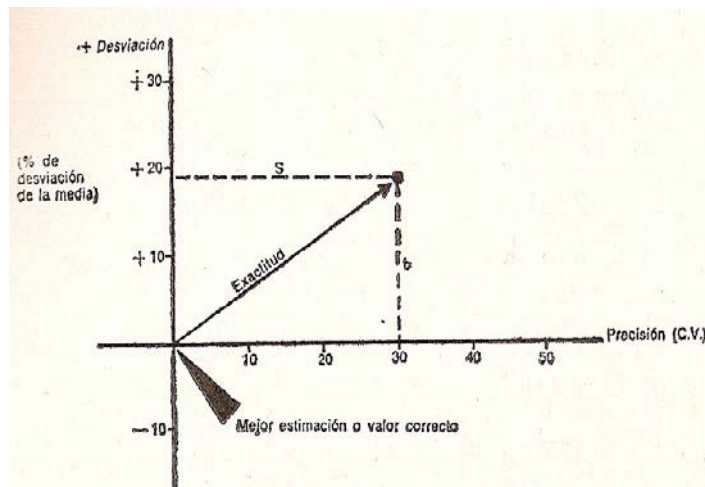


Figura 3. Representación de imprecisión (CV%) y desviación (B%). El valor numérico de la exactitud es la hipotenusa del triángulo rectángulo obtenido.

**VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE MÉTODOS**

En principio, ambos términos tienen un alto nivel de coincidencia dado que determinan la magnitud de los parámetros analíticos de un método, sin embargo, en la práctica se diferencian. Se considera que la *Validación* de métodos es realizada por los fabricantes de

reactivos para uso diagnóstico con el propósito de demostrar que sus métodos cumplen con los Requerimientos de Calidad del analito a medir. En cambio, la *Verificación* de Métodos es realizada por el laboratorio bioquímico con el propósito de demostrar que el reactivo o equipo adquirido reproduce los parámetros analíticos informados por el fabricante. En la verificación se evalúa el desempeño del método (en términos de precisión, veracidad, rango reportable, intervalo de referencia) bajo las condiciones propias de operación del laboratorio (equipo, calibradores, analistas, etc.), para demostrar que cumple con los requisitos para el uso previsto.

**Los métodos analíticos deben ser validados** para comprobar que cumplen con los requisitos de calidad analítica establecidos (Entes Regulatorios, Asociaciones de Normalización de Estándares y Medidas, Fabricantes, etc.). Según la Norma Internacional ISO 17.025, se debe validar los métodos de ensayo no normalizados, desarrollados o diseñados por el Laboratorio y métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto (ampliaciones y modificaciones).

NOTA:

- ISO 15189: 2007 *Sistemas de gestión de la calidad y competencia técnica del laboratorio clínico.*
- ISO 17025: 2005 *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios en calibración y análisis.*

**¿Qué implica validar un método?**

✚ Realizar pruebas que incluyen los siguientes parámetros analíticos:

- Precisión
- Exactitud (Veracidad [Trueness] medida en términos de Bias)
- Linealidad (Criterio similar para validar calibración)
- Rango de Medición
- Sensibilidad
- Límite de Detección
- Límite de Cuantificación
- Robustez (Robustness)

✚ Identificar las fuentes potenciales de errores y cuantificar los errores en el método.

✚ Utilizar equipos que cumplen especificaciones de correcto funcionamiento y calibrados.

✚ Capacitar al operador para tomar decisiones apropiadas en el transcurso de las pruebas.

En Química Clínica, el mayor énfasis se centra en la Precisión, Linealidad y la Exactitud, puesto que constituyen los parámetros analíticos más relevantes que definen la aceptabilidad y la estabilidad analítica de un método durante la ejecución rutinaria. En este sentido, y debido a la dispersión existente en la literatura nacional e internacional referida a la Evaluación de Métodos, *The Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI), anteriormente NCCLS, ha establecido guías para la Validación y Verificación de Métodos, que se identifican con la sigla EP (Evaluation Protocols) y son el resultado del consenso mundial (Tabla 1). A continuación se detallan las guías de CLSI con sus respectivos títulos recomendadas para fabricantes y laboratorios, respectivamente:

**a) Fabricantes**

- **EP5-A2: *Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods.*** Guía para diseñar un experimento para evaluar la precisión de un equipo diagnóstico en química clínica.
- **EP6-A: *Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures.*** Guía para evaluar la linealidad de un método de medición cuantitativa.
- **EP9-A2: *Method comparison and Bias estimation using patient samples.*** Documento que proporciona a los fabricantes (y bioquímicos de laboratorios clínicos) una guía para diseñar un experimento para evaluar el Bias entre dos métodos que miden el mismo analito.
- **EP17A: *Protocols for determination of limits of detection and limits of quantification.***
- **EP21-A: *Estimation of total analytical error for clinical laboratory methods.***
- **C28: *How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory.***

**b) Laboratorios**

- EP10-A: *Preliminary evaluation of quantitative clinical laboratory methods.*** Guía para diseñar experimentos y análisis de datos para la evaluación preliminar de la ejecución analítica de un método.
- EP15-A2: *User verification of performance for precision and trueness.*** Este documento describe la verificación de la precisión y exactitud de un método de interés en química clínica. Utiliza un protocolo diseñado para ser completado en cinco días (o menos) de trabajo, que puede ser aplicado a cualquier laboratorio, independiente de sus recursos.

Tabla 1. Criterios que son aplicados para evaluar la aceptabilidad de los errores estimados en los diferentes experimentos de validación/verificación.

TIPO DE ERROR	EXPERIMENTO
Error Aleatorio (precisión)	Replicación
Error Sistemático	Comparación de Métodos
Error Sistemático Proporcional	Recuperación
Error Sistemático Constante	Interferencia
Error Total (ET)	Replicación y Comparación

## REQUERIMIENTOS DE CALIDAD

Son especificaciones acerca de la tasa de error que puede ser permitida en un método analítico sin invalidar la utilidad clínica del resultado. Pueden aparecer expresados como: *Error Aleatorio máximo permitido*, *Error Sistemático máximo permitido* y *Error Total máximo permitido (ETm)*.

De acuerdo a la declaración de Consenso de la 1ª Conferencia Estratégica de la Federación Europea de Química Clínica y Medicina de Laboratorio (Milán, 2014), se considera que en el proceso analítico se debe aspirar a conseguir el nivel más alto de calidad dentro de una pirámide jerárquica definida, y la especificación elegida debe ser realista para cada tipo de laboratorio.

Para ello se proponen tres modelos diferentes para establecer especificaciones de metas analíticas, que representan una actualización de las especificaciones de calidad de Estocolmo 1999. Los modelos usan distintos principios:

- **Modelo 1.** Basado en la evaluación de los efectos de las prestaciones analíticas en los resultados clínicos obtenidos bajo situaciones clínicas concretas.
- **Modelo 2.** Basado en los componentes de la variación biológica del mensurando.
- **Modelo 3.** Basado en el estado del arte. La principal ventaja de este modelo es que se dispone de una enorme cantidad de datos.

Algunos modelos van a ser más aptos para determinados analitos que otros. Además, se incentiva a los usuarios a expandir los requisitos de desempeño analítico a las etapas pre- y post-analíticas, con metas medibles (ejemplo: indicador de calidad).

Independiente de la manera que se selecciona el ETm, este es el punto de partida para diseñar un programa de CC analítico, el cual debe estar dirigido a garantizar que las mediciones realizadas se conserven dentro de los límites de error previamente fijados.

### Variabilidad Biológica (VB)

La VB es el criterio más utilizado para establecer las especificaciones de la Calidad Analítica, por lo tanto es apto para generar resultados con utilidad clínica. Se define como la fluctuación fisiológica de la concentración de un analito alrededor de un punto de ajuste homeostático y posee dos componentes: la VB intraindividual y la VB interindividual (ver guía Toma de muestra).

La VB ha sido estudiada en un gran número de analitos de interés. Sin embargo, no aplica para drogas, algunos marcadores tumorales y determinaciones cualitativas (www.westgard.com). El método para estimar los componentes de la VB se basa en el análisis de muestras seriadas procedentes de varios individuos, obtenidas siguiendo un protocolo de trabajo establecido.

En función del nivel de calidad que se desee cumplir, y de las prestaciones de la tecnología empleada, se pueden aplicar tres niveles de exigencia en la prestación del laboratorio, denominados *mínimo*, *deseable* y *óptimo*. Todos ellos se expresan en porcentaje y se calculan con las fórmulas siguientes:

	<b>Imprecisión</b>	<b>Error sistemático</b>	<b>Error Total</b>
<b>mínimo</b>	$0,75 \times CV_i$	$0,375 \times (CV_i^2 + CV_g^2)^{1/2}$	$ET = k \ 0,75 \times CV_i^2 + 0,375 \times (CV_i^2 + CV_g^2)^{1/2}$
<b>deseable</b>	$0,50 \times CV_i$	$0,25 \times (CV_i^2 + CV_g^2)^{1/2}$	$ET = k \ 0,50 \times CV_i^2 + 0,25 \times (CV_i^2 + CV_g^2)^{1/2}$
<b>óptimo</b>	$0,25 \times CV_i$	$0,125 \times (CV_i^2 + CV_g^2)^{1/2}$	$ET = k \ 0,25 \times CV_i^2 + 0,125 \times (CV_i^2 + CV_g^2)^{1/2}$

CV<sub>i</sub>: coeficiente de variación biológica intraindividual

CV<sub>g</sub>: coeficiente de variación biológica interindividual

k = 1,65 para 95% nivel de probabilidad

k = 2,33 para 99% nivel de probabilidad

Cada laboratorio puede elegir qué nivel desea alcanzar. Si el laboratorio comienza a trabajar en la fijación de objetivos de calidad, puede ser adecuado iniciar **por los niveles más tolerables, para luego avanzar hacia niveles más exigentes.**

## SISTEMAS DE CONTROL DE CALIDAD

Una vez que el método es aceptable de acuerdo con los Requerimientos de Calidad, es fundamental demostrar que la calidad analítica se mantiene en el tiempo en valores de imprecisión e inexactitud también aceptables. Es decir, el método se ejecuta rutinariamente de manera estable. En términos estadísticos, la estabilidad de un método se traduce en el mantenimiento de la campana de Gauss en el tiempo tal como lo indica la Figura 1. Existen 3 tipos de Control de la Calidad analítica:

- 1. Interno (CCI):** El mecanismo básico consiste en el procesamiento de muestras de control, a las cuales se les realiza un tratamiento estadístico bajo un conjunto de reglas establecidas, que permiten posteriormente aceptar o rechazar la serie analítica. Se controla en cada ensayo (Control Intra-ensayo) y los ensayos sucesivos (Control Entre-ensayos). En ambos casos se evalúan la precisión y la desviación de los resultados.
- 2. Interno-externo:** tiene la misma utilidad y aplicación que el anterior. La principal diferencia radica en que la asignación del valor diana para calcular el ES de una determinada magnitud, se establece con los resultados emitidos por los laboratorios usuarios del mismo material control y con idéntico método analítico. Este tipo de CC está organizado por proveedores comerciales, que aportan el programa informático que facilita el seguimiento del control de la calidad, el cálculo de los indicadores analíticos e incluso la selección de reglas operativas. Este tipo es cada vez más utilizado en los laboratorios clínicos.
- 3. Externo (CCE):** En este caso los materiales control son ciegos. El número de muestras varía, en función del diseño del programa. Una vez procesadas se envían los resultados obtenidos al organizador del programa y éste realiza los cálculos estadísticos oportunos. El CCE puede ser regional, nacional o internacional. Uno de los objetivos del programa es la evaluación continua y a largo plazo del error sistemático de los procedimientos de medida como complemento del CCI.

### Tipos de Control Externo:

- Tipo 1: Diseñado para informar a terceros el desempeño de laboratorios: autoridades, organismos de acreditación, seguridad social, etc.
- Tipo 2: Diseñado para reportar desempeño analítico a los participantes.
- Tipo 3: Diseñado para respaldar soluciones de problemas en los laboratorios.
- Tipo 4: Diseñado para evaluar métodos e instrumental de medición

## CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Una vez que el laboratorio ha realizado la validación o verificación de sus procedimientos de medida, debe establecer una forma de monitorear la estabilidad de los mismos. Para saber si los resultados son realmente correctos, el laboratorio debe implementar un **CCI** basado en la utilización de muestras especialmente preparadas para cumplir el rol de muestras controles (MC), testigos del procedimiento de análisis, de su bondad o de sus fallas. Estas muestras pueden prepararse en el mismo laboratorio o adquirirse comercialmente, cumplimentando los siguientes requisitos:

- ~ Asemjarse lo más posible a las muestras de los pacientes y provenir del mismo origen biológico en que se encuentra el analito en medición: suero, plasma, orina, sangre total, distintos exudados, etc.
- ~ Disponer de MC en distintas concentraciones del analito: bajas, medias y elevadas, abarcando los niveles de decisión médica.
- ~ Contar con un número adecuado de muestras iguales para colocarlas a repetición, en los sucesivos ensayos de la misma especie.
- ~ Capacidad para conservarse en buenas condiciones durante tiempos prolongados, para abarcar numerosos ensayos sucesivos.

Los resultados de estas “muestras controles”, analizados estadísticamente, proporcionan datos de importancia relacionados con la **precisión y estabilidad** de los ensayos a lo largo del tiempo. Esta información es la base de los criterios de aceptación o rechazo de un ensayo, los cuales permiten la toma de decisiones objetivas inmediatas como la repetición de los análisis, o mediatas como el ajuste del procedimiento.

En general, es conveniente colocar la/s MC en cada corrida<sup>1</sup> y registrar su valor en la planilla diaria junto a los datos de las muestras. Así también, evaluar todas las variaciones de las condiciones de trabajo, que facilitará la causa que produce anomalías en el proceso analítico.

### Trazabilidad e Incertidumbre

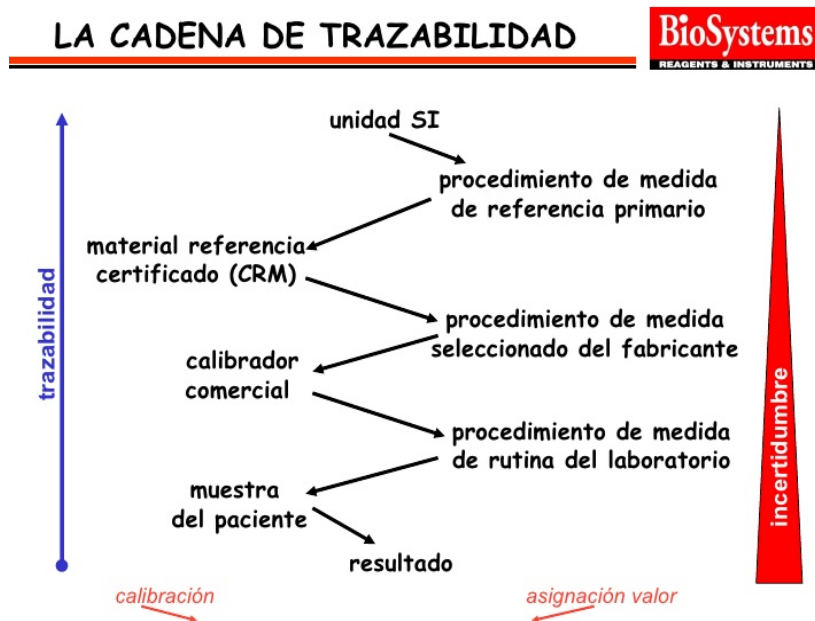
La **trazabilidad** metrológica se define como la propiedad del resultado de una medición o del valor de un calibrador, que lo relaciona con referencias establecidas (generalmente patrones nacionales o internacionales) mediante una cadena ininterrumpida de

---

<sup>1</sup> Corrida analítica: intervalo que puede ser un período de tiempo o un grupo de muestras, para el que debe tomarse una decisión sobre el estado de control.

comparaciones, cada una de las cuales añade una incertidumbre. La **incertidumbre** es un valor asociado al resultado e indica el grado de duda que tenemos sobre ese valor.

En la cadena de trazabilidad, la parte superior de la **jerarquía metrológica**, donde están los métodos y materiales de referencia, es responsabilidad de las organizaciones internacionales como la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC) y de los institutos de metrología, que son los que definen las unidades de medida (SI), los procedimientos primarios y los materiales de referencia. La parte intermedia de la cadena es responsabilidad de la industria de diagnóstico *in vitro*, que prepara calibradores comerciales con valores trazables a las referencias que puedan existir. Finalmente, la parte inferior de la cadena de trazabilidad es responsabilidad del laboratorio clínico, que debe utilizar calibradores que tengan valores con la adecuada trazabilidad para obtener así resultados fiables.



### Características de los materiales usados en el CC interno

Lo ideal es utilizar un suero comercial con elevada confiabilidad, de valores conocidos para cada analito (obtenidos por métodos de referencia) y método de medición. Otra opción es preparar en el laboratorio un *pool* de sueros u orinas a partir de muestras pacientes que se obtienen diariamente (pueden ser normales y patológicos).

La presentación de los materiales control puede ser en forma líquida o liofilizada. Los materiales de control líquidos tienen la ventaja en que no generan errores en su reconstitución.



Características del Control (recomendado por la OPS-OMS):

- |   |   |
|---|---|
| - Origen Humano   | - Matriz sérica                           |
| - Baja Turbidez   | - Liofilizado en refrigeración: 2°C y 8°C |
| - Almacenamiento: líquido -20°C                           | - Caducidad mínima de 1 año               |
| - Libre de riesgos biológicos: negativos a VIH, VHC y VHB |   |

**a) Controles comerciales:** tratados de forma que se conocen sus concentraciones (ej. Standatrol S-E2, Seriscann).

- Pueden ser normales o patológicos.
- Se intercalan diariamente con las muestras
- Sirven para verificar la precisión y la exactitud intralaboratorio.

**La media y el S de los materiales control debe ser establecida por el laboratorio** (el valor asignado por el fabricante debe ser sólo una guía provisoria).

En la actualidad existen controles comerciales denominados “de tercera opinión”, cuyo diseño no está optimizado para ningún instrumento, calibrador o sistema de reactivos específico, proporcionando así una valoración más independiente del funcionamiento del sistema analítico.

**b) Calibradores**

- Material de características cuantitativas conocidas o asignadas (por ej: concentración, actividad, intensidad, reactividad, etc.) que permite comparar la respuesta obtenida con la magnitud a medir.

- Sueros o plasmas o líquidos de viscosidad y características similares al plasma conteniendo metabolitos en concentraciones apropiadas para asegurar una óptima calibración de los analizadores automáticos.

La calibración es uno de los experimentos iniciales en el montaje y estandarización de los métodos en el laboratorio clínico. Tiene como principal objetivo conocer si el método que está en estudio tiene una respuesta lineal y, de ser así, verificar que el intervalo de valores de interés clínico pertenece al segmento lineal. De esta forma, todos los resultados cuyos valores se encuentren en el intervalo lineal, se pueden calcular con un valor del calibrador, que debe tener una concentración próxima al límite superior del intervalo de referencia. Si los valores de interés clínico se ubican total o parcialmente fuera del segmento lineal, es necesario que las muestras sean diluidas para que el resultado obtenido esté incluido en el intervalo lineal. La porción recta de la curva representa el rango analítico útil del método.

**c) Patrones o Estándares:**

- Un analito disuelto en agua o tampón, en concentración conocida.
- Uso por ejemplo en espectrofotometría de punto final (uno para cada técnica).

La *European Community In Vitro Diagnostic Directive (EC IVDD)* exige a los fabricantes asegurar la trazabilidad de los valores asignados a calibradores y materiales de control a través de procedimientos de medición y /o materiales de referencia de alta calidad metrológica.

**Antes de usar calibradores, estándares y controles, verificar:**

- La fecha de vencimiento. Si está vencido, no se puede usar por motivo alguno. Usar siempre los calibradores antes de la fecha de vencimiento que indica el fabricante.
- El número de lote. Usar preferiblemente siempre el mismo lote (indispensable para los controles internos).
- Si se usan productos congelados, se deben descongelar siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante. La homogenización se debe realizar con suavidad unas cuantas veces por inversión del recipiente. Evitar el descongelamiento y congelamiento.

**a) CONTROL DE CALIDAD INTERNO INTRA-ENSAYO**

Es una herramienta de calidad para evaluar presencia y magnitud de errores analíticos dentro de un ensayo. Permite:

- 1- Evaluar la zona de concentración óptima, y establecer los límites fuera de los cuales no deben validarse los resultados.
- 2- Aceptar o rechazar un ensayo, de acuerdo al nivel de imprecisión intra-ensayo (aceptable o no).
- 3- Realizar acciones correctivas o de mejora del procedimiento analítico.
- 5- Conocer el grado de REPRODUCIBILIDAD de cada medición.
- 6- Detectar presencia de un error sistemático o desviación intra-ensayo.

**Perfil de Precisión:** Medición de la imprecisión intra-ensayo:

Estima la variabilidad analítica de las mediciones debido a fuentes de imprecisión dentro de un ensayo. La precisión es expresada en CV% para cada punto de la curva del ensayo (Figura 4).

Para elaborar un perfil de precisión se requiere:

- Trabajar todos los tubos por duplicado: estándares, muestras, controles, etc.
- Tener acceso a las lecturas directas (cpm, absorbancia, N° de fotones por segundo, etc.)
- Realizar un ensayo completo, con más de 30 muestras (valores bajos, medios y altos).

A partir de estos datos se obtiene el **RER**, que es la relación entre la lectura de la respuesta y la magnitud del error (hasta un 5%). Con el valor del RER se encuentra la S por unidad de lectura, y los límites de confianza para determinar el error en la dosis.

### Utilidad del Perfil de Precisión

- Seleccionar entre distintas metodologías o juegos de reactivos (kits).
- Conocer el rango de dosis óptima para un CV% fijo. En la Figura 4 se observa una zona de concentraciones donde la imprecisión intra-ensayo es óptima (baja), y que en concentraciones bajas o altas, la imprecisión es inaceptable (muy elevada).
- Determinar el error (CV%) para un analito en un rango de concentración determinado.
- Conocer la DMD (dosis mínima detectable) y la DMM (dosis máxima medible) para el ensayo.
- Establecer los límites de confianza (Figura 5) en unidades de dosis ( $\pm 2S$ ) para cada valor de dosis ( $X$ ) e informar el correcto resultado:  $\overline{X} \pm 2S$ .

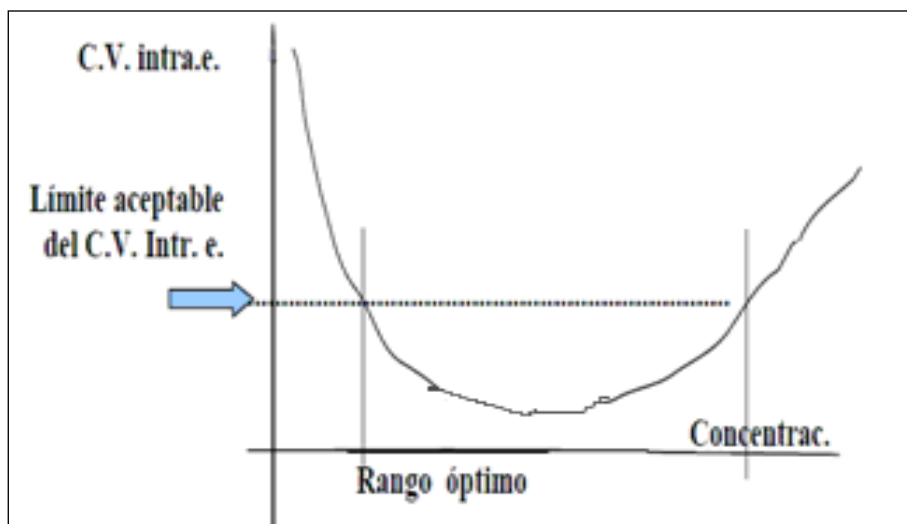


Figura 4. Perfil de Precisión

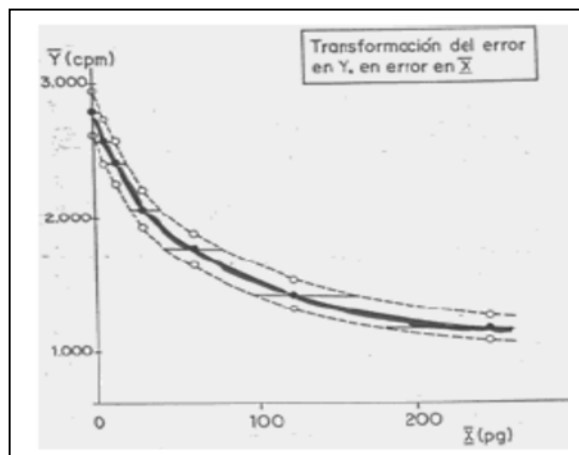


Figura 5. Límites de Confianza

### Detección de la Desviación Intra-ensayo

Cuando se realiza una medición en un ensayo validado con un único estándar o calibrador, se esperaría que éstos, en cualquier ubicación dentro del ensayo posean la misma lectura. Sin embargo, existen situaciones en las que no se tiene la misma respuesta de señal al comienzo, mitad o al final del ensayo para una misma concentración, debido a la presencia de una desviación (desvío) intra-ensayo.

*La presencia de un desvío intra-ensayo inválida el uso de un estándar o calibrador para obtener las diferentes concentraciones de las muestras.*

La detección se realiza procesando por duplicado un pool de sueros, al comienzo y al final del ensayo (el ensayo debe tener más de 12 muestras). El desvío intra-ensayo (dado por la diferencia entre el resultado al inicio y al final del ensayo) debe ser menor que 2 veces la **S** intra-ensayo.

$X_i - X_f < 2 \times S_i$ , con un 95% de confianza ( $\bar{X} \pm 2S$ , de los valores obtenidos en la repetición de una medición).

- $X_i$  = resultado del pool ubicado al inicio del ensayo
- $X_f$  = resultado del pool ubicado al final del ensayo
- $S_i$  = desviación estándar intra-ensayo.

## b) CONTROL DE CALIDAD ENTRE-ENSAYOS

### ➤ Perfiles de Precisión Acumulados

Mediante la superposición de los perfiles de precisión de diferentes ensayos de un mismo analito, es factible realizar un control entre ensayos, y así evaluar si la calidad de los mismos se mantiene constante y los resultados son comparables. Se dice que se controla la **robustez** del ensayo.

### ➤ Cartas de control

Tiene como objetivo verificar la reproducibilidad del ensayo. Estima la variabilidad analítica de las mediciones debido a fuentes de imprecisión entre ensayos consecutivos (entre turnos mañana, tarde y noche, o entre días). Implica la construcción de las Cartas de Control de *Levey-Jennings*, gráficos que muestran los valores de los “testigos” en los ensayos sucesivos. Se obtienen a partir del registro hecho por el laboratorio durante al menos 20 días (Figura 6).

### **Tipos de representaciones**

- Concentración de la muestra en función del N° de ensayo.
- Porcentaje de desviación del resultado con respecto a la media (calculada por ensayos previos) en función del N° de ensayo.
- Resultados en desviación estándar de la media en función del N° de ensayo.

Si el procedimiento analítico muestra buena precisión y el error sistemático es despreciable, se espera que los valores del control se encuentren dentro de una distribución normal [ $\pm 2S$  (95,5%)].

Los gráficos de control pueden ayudar a detectar los siguientes efectos:

- Aparición de una desviación (sesgo): cuando una serie consecutiva de valores se distribuye a un lado de la línea central, sin variar la precisión del procedimiento, pero sí un cambio en el valor promedio.
- Tendencia progresiva a obtener valores crecientes o decrecientes (deriva).
- Cambios cíclicos o periódicos.

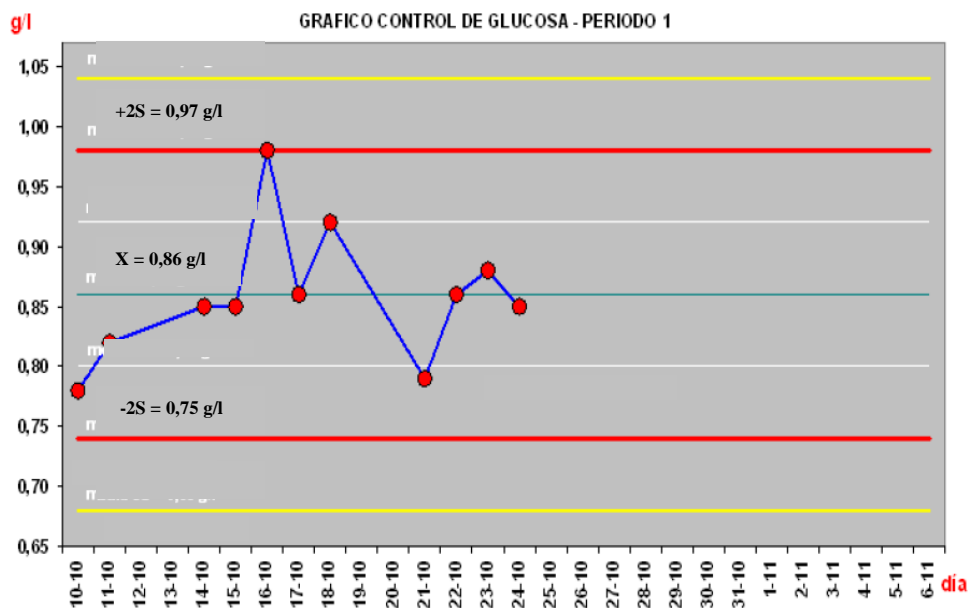


Figura 6: Alteraciones que pueden observarse en una gráfica de *Levey-Jennings*

Además de estos tipos de gráficos, existen otros más complejos que no vamos a abordar en esta guía, como el gráfico de control de sumas acumuladas (CUSUM, el cual es más sensible y rápido para la detección de derivas) o el gráfico de control de medias móviles exponencialmente ponderadas (EWMA, el cual, al dar más peso al punto más actual, representa mejor el estado del procedimiento).

### Reglas de Westgard

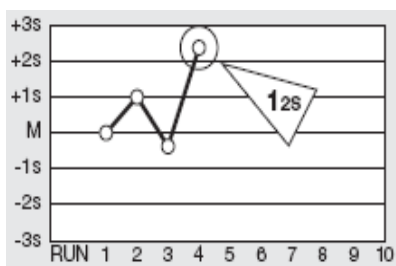
Son reglas basadas en principios estadísticos que se incrementa la probabilidad de detectar errores. La nomenclatura de las reglas combina el número de observaciones que no cumplen el criterio de calidad, con el número de S señalado en el subíndice.

- 1) **Regla 1<sub>2S</sub>**: el resultado del control queda fuera del margen de las 2 desviaciones estándar (S), pero dentro de las 3 S. Es una regla de advertencia que conduce a la vigilancia de los siguientes resultados de control de calidad.
- 2) **Regla 1<sub>3S</sub>**: el resultado del control queda fuera del margen de las 3 S y detecta fundamentalmente el error aleatorio o el inicio de un notable error sistemático.
- 3) **Regla 2<sub>2S</sub>**: Dos resultados consecutivos del control se alejan de la media en el mismo sentido más de 2 S. Detecta tempranamente el error sistemático y se rechaza la serie de resultados analíticos.
- 4) **Regla R<sub>4S</sub>**: La diferencia entre dos valores de control consecutivos excede las 4 S. Detecta el error aleatorio y se rechaza una serie analítica.
- 5) **Regla 4<sub>1S</sub>**: Cuatro valores consecutivos del control se alejan de la media más de 1 S por el mismo lado. Detecta el error sistemático aunque no lleva al rechazo de la tanda.

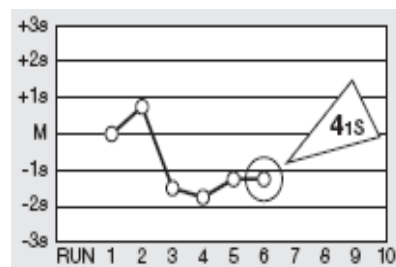
analítica, sino a entenderlo como aviso de necesidad de mantenimiento o calibración del sistema.

- 6) **Regla 10x.** Diez valores consecutivos de control están situados del mismo lado de la media. En una regla de aviso que detecta el error sistemático.

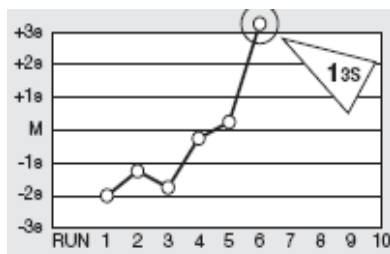
Las reglas 1 y 5 son de ALERTA. Si no se cumple alguna de estas reglas se debe activar una revisión de los procedimientos del ensayo, calidad los reactivos y calibración de los equipamientos. La 2, 3, 4 y 6 son reglas de RECHAZO de los resultados. Debe corregirse el error, y repetir todo el ensayo. Solo una vez obtenido un valor que no tiene criterios de rechazo, se puede validar todo el ensayo.



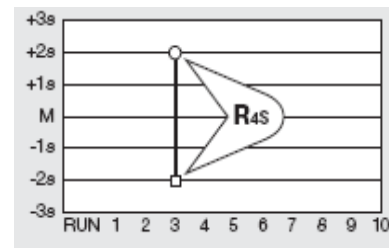
Regla 1-2S. Alerta



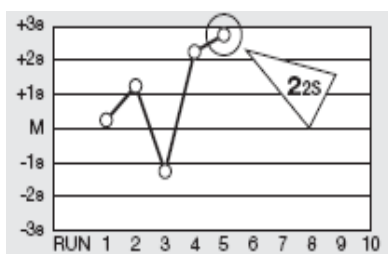
Regla 4-1S. Alerta



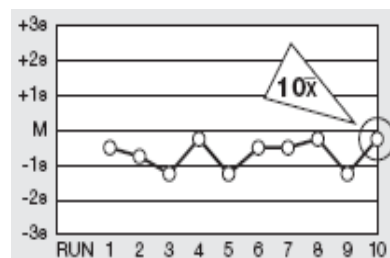
Regla 1-3S. Rechazo



Regla R-4S. Rechazo



Regla 2-2S. Rechazo



Regla 10x. Rechazo

## Actitud ante un resultado fuera de control

1. Examinar los gráficos de control para determinar el tipo de error.
2. Relacionar el tipo de error a causas potenciales.
3. Considerar factores comunes
4. Relacionar el origen del problema a cambios recientes en el sistema.
5. Verificar la solución y documentar el remedio.

Es un mal hábito repetir el control varias veces sin verificar la causa potencial del error mediante los pasos anteriores, así como no registrar las acciones tomadas ante valores fuera de rango, trabajar con S muy amplias o utilizar las mismas reglas de control para todos los analitos.

## HERRAMIENTAS DE EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO ANALÍTICO

### □ Seis-Sigma

El modelo **Seis Sigma** (*six-sigma*) es una técnica para monitorear defectos y mejorar la calidad, así como provee de herramientas estadísticas que permiten evaluar de forma objetiva el rendimiento del laboratorio, diseñar esquemas para la gestión del control de calidad y comparar diferentes procesos de forma universal. Hace referencia a la capacidad que tiene esta metodología de estimar la variabilidad de un procedimiento, en términos de desviación típica o de fallos (defectos) por millón.

El valor Seis Sigma ideal implica que la variabilidad de un proceso debe caber 6 veces dentro del límite aceptable preestablecido, para considerar que el proceso funciona perfectamente, lo que equivale a 3,4 defectos por millón de oportunidades (en el laboratorio clínico 3,4 resultados erróneos por cada millón de resultados entregados). Si se asume una distribución Gaussiana en la variación de un proceso, el área en las colas de la distribución se puede utilizar para estimar los defectos previstos (Figura 7).

El sistema seis-sigma requiere que se fijen límites de tolerancia para describir buena calidad e identificar pobre calidad o defectos. Por lo tanto, laboratorio debe conocer su “Error Total” de medición, concepto que integra la variabilidad aleatoria y la sistemática. En el laboratorio de análisis clínicos, la métrica sigma se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de Sigma} = \frac{\% \text{ETa} - \% \text{sesgo}}{\% \text{CV}}$$

**%ETa:** Error Total Aceptable (VB, CLIA)

**% Sesgo:** Inexactitud, obtenida del control de calidad externo

**%CV:** Imprecisión, obtenida del control de calidad interno



El nivel máximo de la calidad según el sistema seis sigma se alcanza con un elevado desarrollo tecnológico que incluya automatización, robótica e informática y, por supuesto, unas muy buenas prácticas de laboratorio.

Para los analitos con VB muy ajustada (albúmina, calcio, sodio, proteínas totales, creatinina) se calcula el número sigma considerando ETa con especificación de VB mínima, ya que la especificación por VB deseable no es alcanzable por el estado técnico del arte del sistema de medición (datos extraídos del programa de la evaluación externa de la calidad o de ensayo de aptitud). Para analitos con VB amplia (triglicéridos, hierro), se eleva el nivel de exigencia hacia una meta analítica con especificaciones de VB óptimas.

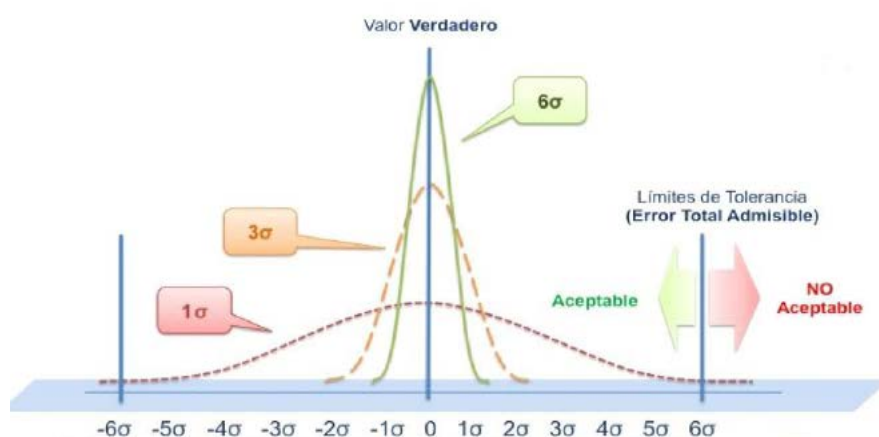


Figura 7: Relación entre la variabilidad de un proceso y su valor sigma. A menor variabilidad del proceso, la curva de Gauss es más estrecha, y un mayor número de “ $\sigma$ ” quedan incluidos dentro de los límites de tolerancia.

La sigma ( $\sigma$ ) hace referencia al **número de desviaciones estándar o típicas** que se incluyen dentro del límite aceptable preestablecido. Los valores de sigma obtenidos son inversamente proporcionales a la exigencia de la especificación de la calidad escogida. Se considera como la mínima calidad aceptable en el laboratorio clínico un sigma de 3.

□ **Gráficas de especificaciones operativas (OPSpecs Charts)**

Constituyen una herramienta que ilustra gráficamente la relación entre los límites tolerables de error para la magnitud, las prestaciones analíticas del método (error sistemático, imprecisión) y la detección de error del procedimiento de control (Figura 8). La recta con menor pendiente describe las especificaciones de error sistemático y aleatorio máximas con las que el procedimiento analítico no sobrepasa el error tolerable. Los valores de imprecisión y error sistemático del procedimiento analítico se localizan mediante un “punto operativo”, todas las líneas situadas a la derecha del punto se corresponden con

procedimientos de control que garantizan detectar el error tolerable. En los OPSpecs Charts “normalizados”, el Bias y el CV se expresan como porcentaje del TEa (Bias/TEa x 100; CV/TEa x 100).

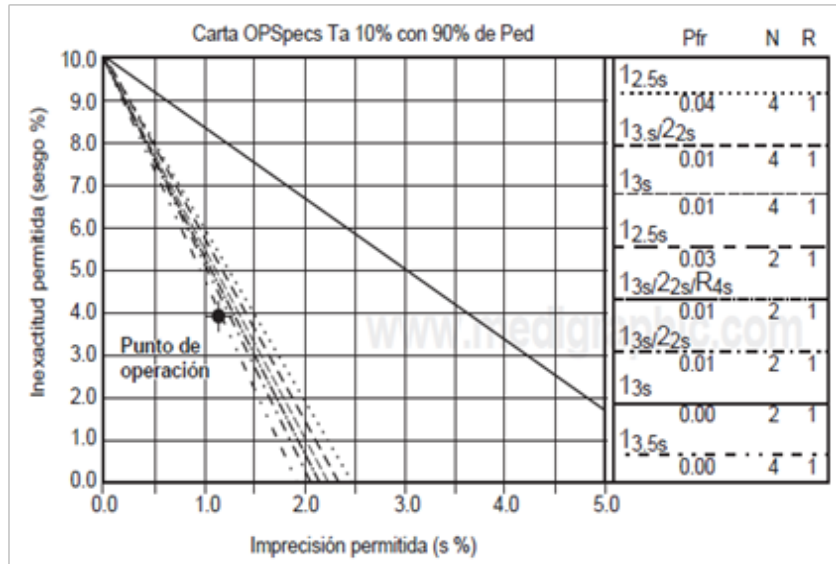


Figura 8: *Carta OPSpecs*. Muestra el punto de operación para la inexactitud o sesgo (abscisa) e imprecisión (ordenada) del método cuando se usan diferentes procedimientos de control de calidad. Se seleccionó la regla de control 13s (mejores características de detección de error y menos falsos rechazos con dos materiales de control). [www.medigraphic.com](http://www.medigraphic.com)

A la derecha de *las Cartas OPSpecs* aparecen tabuladas las reglas control propuestas, con las probabilidades de detección de error y de falso rechazo, el número de controles y el número de corridas analíticas. Cada regla o combinación de ellas tiene posee una determinada probabilidad de detectar errores significativos y una cierta probabilidad de generar falsos rechazos.

- **Probabilidad de falso rechazo (Pfr):** Describe la probabilidad de que una corrida analítica sea rechazada cuando no hay errores en los resultados, salvo el inherente a la propia imprecisión del método. Lo ideal es 0.0 (0%). En la práctica, 0.05 (5%).

- **Probabilidad de detección de errores (Ped):** Describe la probabilidad de que una corrida analítica detecte errores analíticos verdaderos, que se adicionan al inherente a la propia imprecisión del método. Lo ideal es 1.0 (100%). En la práctica, 0.90 (90%).

**La interpretación y relación de sigma con las reglas operativas es:** (Figura 9)

- Sigma 6-5: reglas amplias  $1_{3s}$  ó  $1_{2.5s}$  con 2 controles por serie analítica.
- Sigma 4: regla simple con 4 controles
- Sigma 3: multireglas con 4-6 controles.
- Sigma <3: aplicar máximo rigor en el control de la calidad.

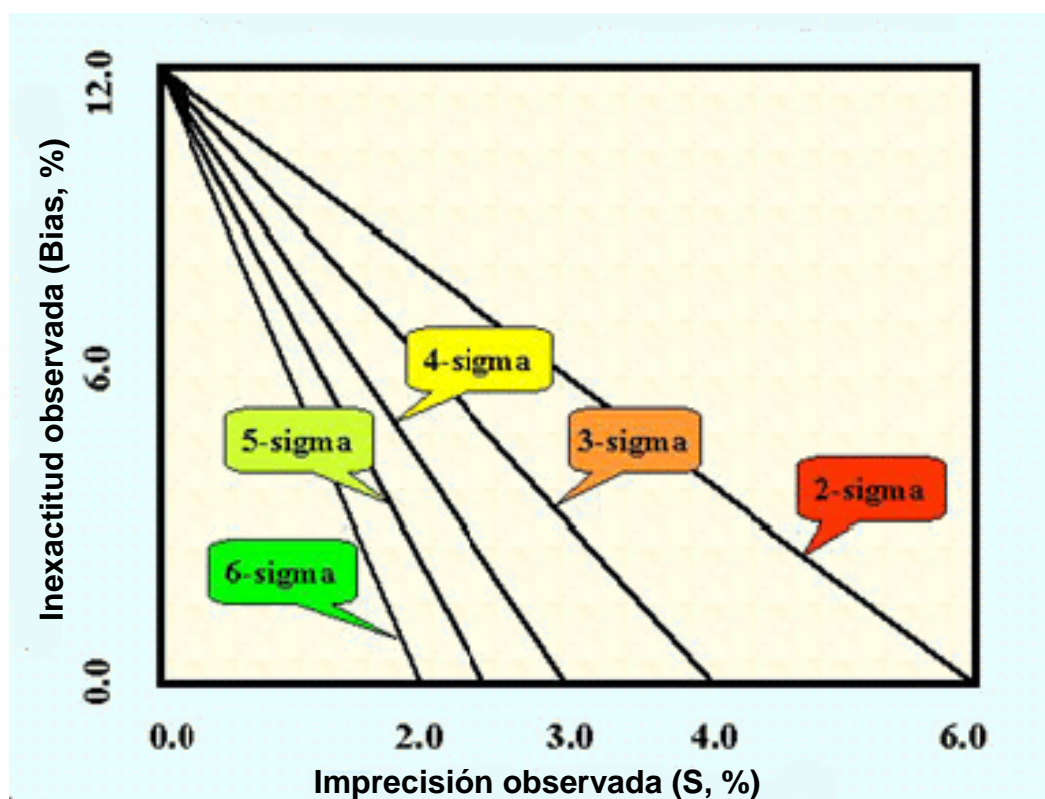


Figura 9: Gráfica OPSpecs-SIX SIGMA

## ACTIVIDAD PRÁCTICA

### A- PARTE EXPERIMENTAL

Evaluar el Control de: 1) Exactitud fotométrica, 2) Linealidad fotométrica y 3) Precisión fotométrica.

#### 1- CONTROL DE LA EXACTITUD FOTOMÉTRICA

La **exactitud fotométrica** es el grado de concordancia entre la absorbancia real y la medida. El error cometido al leer una absorbancia respecto de una de referencia se denomina *inexactitud fotométrica*.

Frecuencia del control: se recomienda realizar el control mensualmente, alternando un mes el control en la zona UV y el mes siguiente en la zona del Visible.

#### FUNDAMENTO

El estudio de la exactitud fotométrica consiste en la medición de absorbancias de soluciones certificadas, comparando los valores hallados con los de referencia.

#### REACTIVO

**Nitrato de Cobalto en Ac. Sulfúrico 0,37 N** (B1 a B4 equivalen a diluciones al medio).

Para la preparación de las soluciones de referencia se emplean drogas grado analítico, pureza 99,5 % (mínimo), y agua grado reactivo tipo I, previa comprobación de ausencia de sustancias reductoras (las soluciones fueron cedidas por el Programa de Evaluación Externa de Calidad (PEEC) – FBA).

#### PROCEDIMIENTO

- 1) Medir la absorbancia de las soluciones y comparar dicho valor con los que figuran en los certificados correspondientes. Realizar un blanco con agua destilada. Realizar todas las medidas por duplicado.

#### CONDICIONES DE TRABAJO

- Solución de Referencia: Nitrato de Cobalto 0,37 N
- $\lambda$ : 510 nm en Espectrofotómetro
- Temperatura de trabajo: 25 °C (1 cm de camino óptico)

[Sol]	$\lambda$	Abs1	Abs2	Abs Media	Abs Ref	% Inexact. Fotom
B1	510				0,165	
B2	510				0,314	
B3	510				0,657	
B4	510				0,808	

2- Calcular la inexactitud fotométrica como la diferencia entre la absorbancia promedio hallada y el valor de referencia que se detalla en los certificados respectivos.

$$\% \text{ Inexactitud fotométrica} = \frac{(\text{Abs. hallada} - \text{Abs. referencia})}{\text{Abs. referencia}} \times 100$$

### Interpretación de Resultados

- En función de los límites de aceptabilidad interpretar el resultado obtenido.

Límites de aceptabilidad:

- Exactitud fotométrica óptima: error entre  $\pm 2 \%$
- Exactitud fotométrica aceptable: error entre  $\pm 3 \%$

## 2- CONTROL DE LA LINEALIDAD FOTOMÉTRICA

La **linealidad fotométrica** representa la capacidad de respuesta lineal de un espectrofotómetro a diferentes concentraciones de sustancia que cumpla la ley de Beer.

Frecuencia del control: se recomienda realizar el control de linealidad en forma trimestral. La secuencia anual recomendada es:  $\lambda$ : 340 (Dicromato de Potasio),  $\lambda$ : 405 (p-Nitrofenol),  $\lambda$ : 340 y 510 (Sulfato de cobalto) nm.

### FUNDAMENTO

El estudio de la linealidad fotométrica permite establecer el rango de Abs. en el que el instrumento tiene respuestas proporcionales a los cambios de concentración.

### REACTIVO

**Nitrato de Cobalto en Ac. Sulfúrico 0,37 N** (B1 a B4 equivalen a diluciones al medio)

## PROCEDIMIENTO

- 1) Para determinar la linealidad se emplearán los datos del ejercicio 1.
- 2) Graficar las Abs promedios halladas (eje y) en función de las Abs de referencia (eje x). Realizar el estudio de regresión lineal de la recta hallada, empleando calculadora científica o programas de computación tipo Excel.

$$\text{Ecuación de la recta: } \underline{y = a + bx}$$

b: pendiente  
a: ordenada al origen

La pendiente b representa la linealidad fotométrica. La recta ideal sería  $y = x$  en la cual la pendiente es 1,00, lo que indica que el instrumento responde linealmente en el rango de Abs estudiadas.

## Interpretación de Resultados

- En función de los límites de aceptabilidad interpretar el resultado obtenido.

### Límites de aceptabilidad

- Pendiente ideal: 1
- Pendiente óptima: entre 0,98 y 1,02
- Pendiente aceptable: entre 0,97 y 1,03

Pendiente hallada:

Observaciones:

## 3- CONTROL DE LA PRECISIÓN FOTOMÉTRICA

La **precisión fotométrica** es la medida de la dispersión de una serie de mediciones de transmitancia o Abs alrededor de la media, expresándose como coeficiente de variación porcentual (CV%).

Frecuencia del control: se recomienda realizar el control de precisión en forma mensual.

## REACTIVO

**Sulfato cúprico en Ac. Sulfúrico** ( $\lambda$ : 650 nm)

## PROCEDIMIENTO

- 1) Seleccionar la  $\lambda$ : 650 nm (o la más cercana, preferentemente superior) que su instrumento posea. Seleccionar la temperatura a la que habitualmente trabaja a esta  $\lambda$ .
- 2) Realizar un blanco con agua destilada y proceder a medir 10 veces la Abs de la solución de la siguiente manera: cargar una cubeta con la solución y leer la Abs. retirarla del



**¿Cómo procede?**

a) Trabajar con duplicados. Para cada par de duplicados, se calcula la media ( $\bar{X}_y$ ) y la diferencia de valor absoluto ( $\bar{\Delta Y}$ ):

Concentración de T4	Cpm promedio	Diferencias ( $\Delta Y$ )
1	11466	245
2,5	7783	308
5	5045	189
10	3788	211
20	2699	90
1	2129	238
2	7783	244
3	5045	544
4	3788	38
5	2629	204
6	7111	12
7	5550	208
8	6660	156
9	5239	87
10	4332	180
$\Sigma$ Promedios		
$\Sigma$ Diferencias entre duplicados		

RER:
LC: 1,414*RER

Concentración	Cpm promedio	LC: Cpm promedio*LC	Lim. Sup	Lim. Inf
0	14968			
1	11466			
2,5	7783			
10	3788			
20	2699			
5	5045			

b) Obtener por separado:  $\Sigma \bar{Y}$  y  $\Sigma \bar{\Delta Y}$

c) Hallar el RER del ensayo o “relación error-respuesta”.

$$RER = \Sigma \Delta Y / \Sigma Y$$



- d) Determinar los límites de confianza (LC) de la curva dosis-respuesta. Considerar que  $LC = 1,41 \times RER$ .
- e) Calcular el LC de los promedios correspondientes a la curva estándar. Multiplicar cada promedio de la curva estándar por el LC, que luego se resta y se suma al promedio para hallar las nuevas curvas límites (Figura 5).
- f) Representar gráficamente la curva promedio dosis-respuesta y sus curvas límites.
- g) Hallar los rangos de dosis o segmentos entre las bandas para cada punto de la curva estándar, que corresponden a 4 S. El valor del segmento en unidades de dosis dividido 4, permite hallar S (X). A Con el valor de 1S, se puede obtener el CV% para cada valor de dosis.
- h) Representar el CV% en función de la concentración para obtener la gráfica del perfil de precisión.
- i) Interpolarse el valor de  $\bar{X}$  de cada muestra en el perfil de precisión y obtener el CV% correspondiente. Interprete el error en cada punto del perfil de precisión.

**2)** En el laboratorio se determina colesterol (mg/dL) por técnica enzimática. Se prepara el lote N° F-91 de control de calidad. Se procesan los resultados, por duplicado, por 10 días (ver los datos de la tabla).

- a) Informar la precisión del ensayo.
- b) Confeccionar la gráfica de control.
- c) Determinar si es aceptable el ensayo.

**¿Cómo procede?**

Día	X1	X2	$\bar{X}$	S	Varianza (S <sup>2</sup> )
1	208	212			
2	212	213			
3	214	216			
4	212	217			
5	205	209			
6	204	210			
7	209	215			
8	204	207			
9	210	211			
10	210	214			
Σ de las Medias				Σ de las Varianzas	
Media de las Medias				Varianza intra-ensayo	

SD intra-ensayo:		
CV intra-ensayo:		
GRAFICAR	Lím. inf	Lím. sup
1 S:		
2 S:		
3 S:		

### Interpretación de Resultados

En base a los datos estadísticos obtenidos, determinar la aceptabilidad del ensayo: Criterio estadístico para la Técnica de colesterol enzimático, el CV% no debe ser mayor del 5%.

**3)** La determinación del Tiempo de Protrombina (TP) o Tiempo de Quick es una prueba global para la evaluar la coagulación sanguínea. Se aplica para estudios de rutina prequirúrgicos, detección de alteraciones en los niveles de los factores de coagulación (uno o más factores involucrados en la vía extrínseca), control en la terapéutica con anticoagulantes orales.

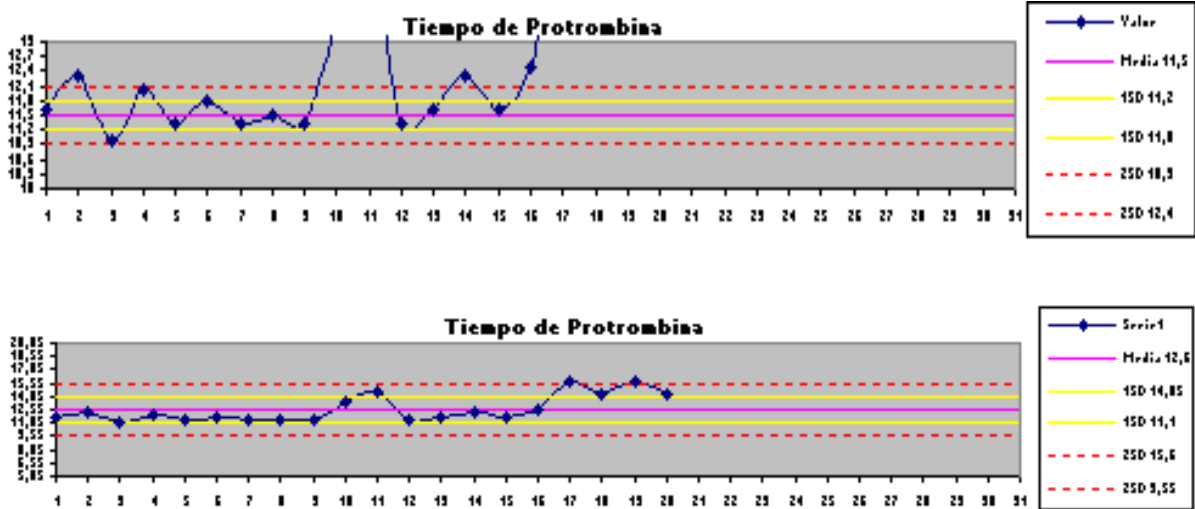
En el laboratorio por un periodo de diez días se analizaron 20 muestras del mismo lote de control interno entre el turno mañana y tarde arrojando los siguientes valores:

Los datos de la muestra control calculados por el fabricante fueron: media (11,5 segundos); CV%: 3,5% y S: 0,3 segundos.

	TURNO MAÑANA TP (segundos)	TURNO TARDE TP (segundos)
1	11,6	12,3
2	11	12
3	11,3	11,8
4	11,3	11,5
5	11,3	13,3
6	14,6	11,3
7	11,6	12,3
8	11,6	12,5
9	15,6	14,3
10	15,6	14,3
<b>X</b>		
<b>SD</b>		
<b>CV</b>		

- a) Analizar los resultados obtenidos.
- b) Calcular la media, S y CV% propias del laboratorio.
- c) Interpretar los parámetros estadísticos suministrados por el fabricante respecto a los obtenidos por el laboratorio.

4) Analizar las siguientes cartas de control:



5) Calcular el valor de los errores para los tres niveles críticos de la glucemia:

$CV_i = 5.7\%$        $CV_g = 6.9\%$

Nivel	Error aleatorio	Error sistemático	Error total
Mínimo			
Deseable			
Óptimo			

6) En un estudio de tamizaje en Uganda para validar el uso de pruebas rápidas para detectar posibles infectados por el VIH se incluyó a 1517 sujetos adultos sexualmente activos, los resultados de pruebas rápidas se contrastaron con el posterior diagnóstico obtenido de infección VIH por medio de ELISA y Western Blot (WB).

De los 295 resultados positivos a las pruebas rápidas, 166 fueron confirmados por ELISA y WB. Los sujetos seropositivos al VIH detectados por ELISA y WB fueron 170 y los seronegativos al VIH 1347.

- a) Calcular sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo. Interprete los resultados.

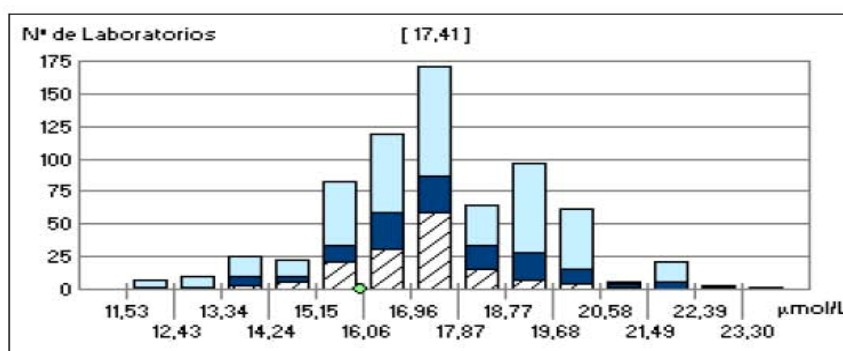
	ELISA WB +	ELISA WB -	TOTAL
PR VIH +	166	129	295
PR VIH -	4	1,218	1,222
TOTAL	170	1,347	1,517

b) ¿Qué implicancias tienen o que problemas plantea para la práctica de tamizaje los resultados falsos negativos resultantes? ¿Por qué es esto importante?

7) A partir del siguiente gráfico de CCE:

- Analice la aceptabilidad del resultado
- Calcule el desvío porcentual (límite óptimo <15,5%) y el índice de desvío estándar (z)
- ¿En dónde se ubicaría un resultado rechazado y cuáles podrían ser las causas de ello?

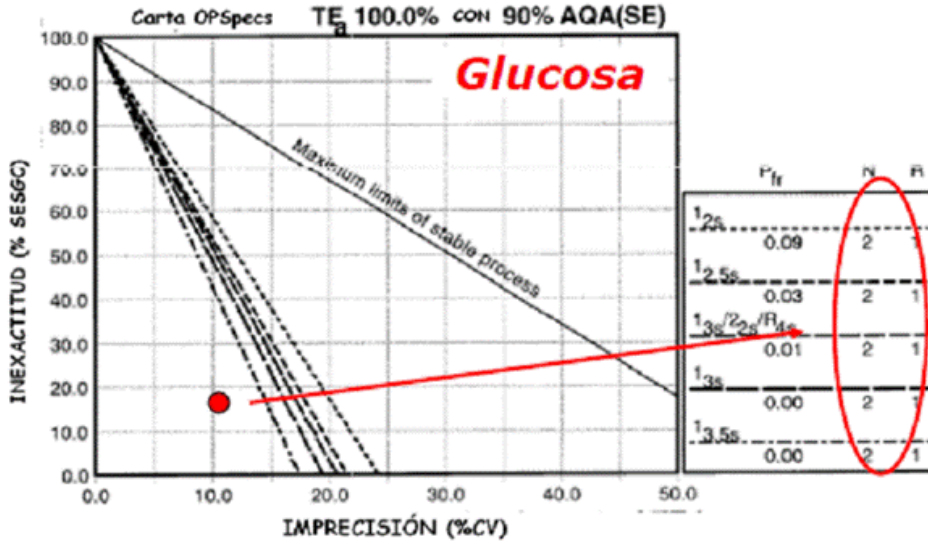
2-4 y 2-5 Dicloroanilina diazoada (DPD)  
0101. Modular Analytics D/P, Hitachi



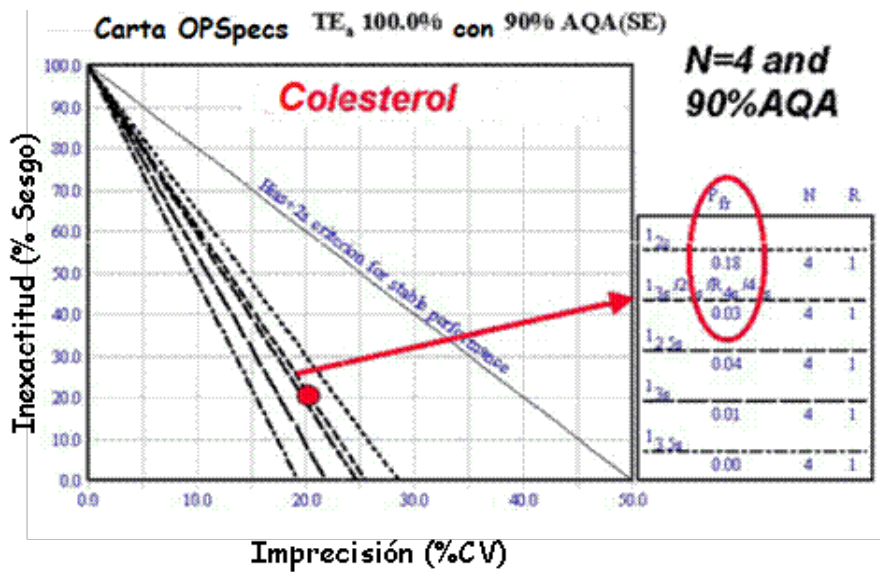
Resultados:	Núm. de labs.			
	Total	Aceptados	Media	s
Todos los labs.	711	689	17,41	2,00
Por su método	300	289	17,33	1,71
Por su instrumento	151	147	17,05	1,24

8) Analizar los siguientes gráficos OPSpecs normalizados:

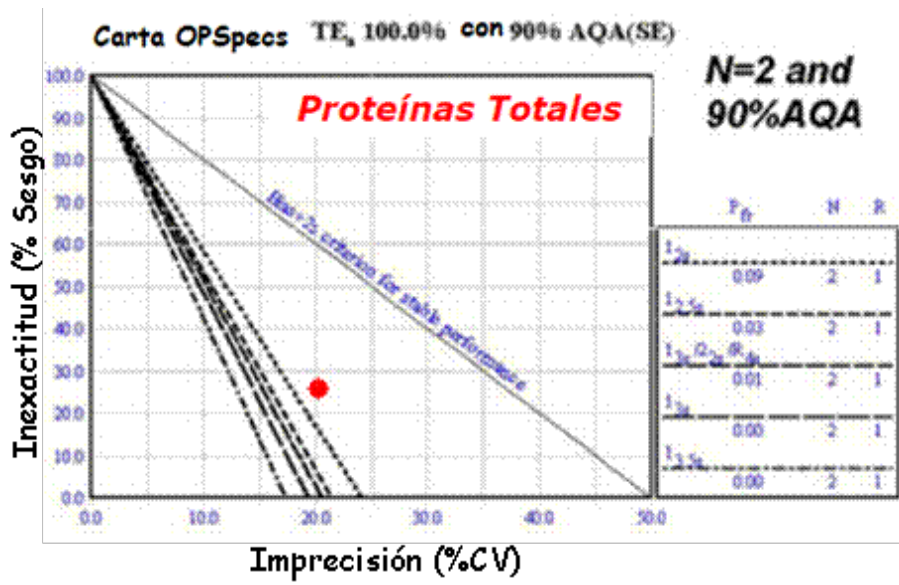
a- Glucosa: TEa: 10%; Sesgo: 1,5%; CV: 1,0 %; N: 2



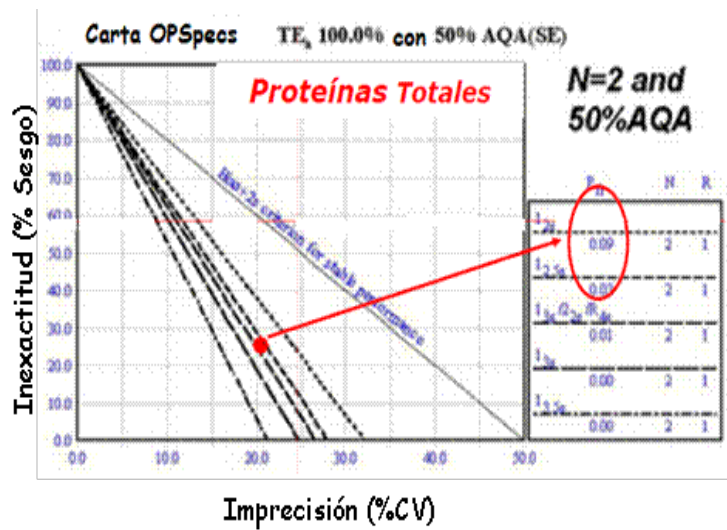
b- Colesterol: TEa: 10%; Sesgo: 2,0%; CV: 2,0 %; N: 4



c- Proteínas Totales: TEa: 10%; Bias: 2,5%; CV: 2,0 %; N: 2



d- Proteínas Totales: TEa: 10%; Bias: 2,5%; CV: 2,0 %; N: 2



## BIBLIOGRAFÍA

- SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD EN EL LABORATORIO: Manual. Organización Mundial de la Salud 2016. ISBN: 978-92-4-354827-2.
- CALIDAD EN EL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA: CONCEPTO, HERRAMIENTAS Y EJEMPLOS DE APLICACIÓN. MH Condori Arenas y LJ Morales García. Curso de formación continuada a distancia 2011-2012. AEBM, 2012. ISSN: 1988-7469.
- EL LABORATORIO EN EL DIAGNOSTICO CLINICO. JB HENRY. 20ª Edición. Ed. Marbán, España 2010.
- PLANIFICANDO UN SISTEMA DE CONTROL DE CALIDAD INTERNO. INTRODUCCIÓN AL ANÁLISIS SIGMAMETRIC. A Bagnarelli. Bioquímica y Patología Clínica 2009; 73: 15-26.
- TRAZABILIDAD METROLÓGICA, VALIDACIÓN ANALÍTICA Y CONSENSO DE RESULTADOS EN LA CONFIABILIDAD DEL LABORATORIO CLÍNICO. A Terrés Speziale. Revista Mexicana Patología Clínica 2009; 56: 27-35.
- GESTIÓN DE LA CALIDAD EN EL LABORATORIO CLÍNICO. D Mazziotta y C Fernández Espina C. 1ª Edición. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires 2005.

## SITIOS WEBS

- <http://www.westgard.com>
- <http://www.seqc.es>

## TRABAJO PRÁCTICO N° 3

### ANÁLISIS DE ORINA COMPLETA



#### OBJETIVOS

- Realizar un examen completo de orina.
- Observar las diferencias entre una muestra de orina normal y una patológica al microscopio óptico.

#### INTRODUCCIÓN

El riñón es un órgano que participa en el mantenimiento de la homeostasis del organismo a través de la regulación del volumen y composición química del medio interno, dado por el equilibrio hidroelectrolítico y ácido-base. En un adulto normal, los riñones sirven para convertir cada día más de 170 litros de sangre en aproximadamente un litro de un fluido concentrado altamente especializado llamado *orina*. De este modo, el riñón mediante la filtración glomerular y la secreción tubular excreta los productos de desecho del metabolismo (urea, creatinina, fósforo, entre otras) mientras que otras sustancias son conservadas por su reabsorción en el órgano.

En diversas situaciones fisiológicas o patológicas, el *análisis de orina*, permite arribar a un diagnóstico e incluso orientar al tratamiento de las enfermedades renales, como también detectar alteraciones del metabolismo o anomalías endocrinas, que no guardan relación directa con el sistema urinario. Esto se refleja en la orina en forma de modificaciones químicas o citológicas.

#### Organización general del análisis de orina

- |   |   |   |
|---|---|---|
| 1. Recolectar la muestra                                | } | Pruebas de seguimiento<br>si son necesarias |
| 2. Proceder al examen visual                            |   |   |
| 3. Realizar el examen químico por tiras reactivas       |   |   |
| 4. Medir la densidad                                    |   |   |
| 5. Centrifugar la muestra de orina                      |   |   |
| 6. Examinar el sedimento urinario al microscopio óptico |   |   |



### **Determinaciones básicas en el análisis de orina**

- Examen físico
- Examen químico
- Examen microscópico / examen del sedimento

Antes de proceder a ningún examen se debe evaluar la orina en términos de aceptabilidad. Por ello es importante indicar al paciente como debe proceder para que la toma de la muestra sea correcta.

Entre las consideraciones a tener en cuenta:

- El rotulado del recipiente sea adecuado (nombre del paciente, fecha y hora de recolección).
- La recolección, conservación y transporte del espécimen sean los apropiados.
- La ausencia de signos visibles de contaminación.

La orina debido a la dieta y diversas circunstancias hacen que los componentes de la misma se modifiquen durante las distintas horas del día. Los posibles retrasos en el transporte pueden causar deterioro de la muestra.

Para el examen de orina completa, la orina de preferencia es la primera de la mañana, que es la más concentrada y lo más indicado es la técnica del chorro medio. En caso de ser un análisis de urgencia, se podrá aceptar orinas con un mínimo de tres horas de retención.

### **EXAMEN FÍSICO**

Comprende una serie de evaluaciones cualitativas y cuantitativas:

#### **COLOR**

La orina es de color amarillo ámbar debido a la presencia del pigmento urocromo y de pequeñas cantidades de uroeritrina y urobilina. Dentro de la normalidad el color amarillo puede ser muy variable (pálido a oscuro), como sucede por la toma de abundante líquido o la ingesta de dietas secas, sudoración profusa, vómitos, diarreas, etc.

Las orinas patológicas presentan diferentes coloraciones. El color anormal más frecuente es el rojizo o marrón por la presencia de sangre o a pigmentos biliares.

- El color rojizo sugiere la presencia de sangre. A su vez, el urobilinógeno, rifocina y la ingesta de vegetales (remolacha), entre otras, pueden confundirse con el color rojizo de la hematuria macroscópica, que se caracteriza porque al ser observada a trasluz exhibe

opalescencia con estrías tornándose transparente por el agregado de unas gotas de ácido acético.

- Un *color amarillo intenso*, se muestra en orinas de alta densidad, por oliguria de causa extrarrenal, en ictericias, por ejercicios intensos, fiebre y dietas restringidas en líquidos. En caso de ictericia se obtiene una mayor evidencia cuando se agita la orina y la espuma se tiñe de amarillo.

- *Orinas blanquecinas o lechosas*, en quilurias y piurias severas.

- *Orinas verdosas o azuladas* se deben principalmente a la ingesta de azul de metileno (usado como bacteriostático, antiséptico, en infecciones urinarias). El color amarillo de la orina sumado al azul del colorante, dan un tono verdoso.

## ASPECTO

La orina normal recién emitida es límpida, y en reposo deposita una nubécula que contiene mucus, leucocitos y células siendo más abundante en mujeres por las secreciones vaginales y cristales.

Las orinas límpidas pueden tornarse turbias por enfriamiento, cuando son guardadas en la heladera para su conservación, debido a la precipitación de uratos amorfos que le confiere un color rosado y aparecen en orinas ácidas.

La turbidez anormal en la orina puede atribuirse a la presencia de fosfatos, uratos, pus, crecimiento bacteriano y sangre. Los fosfatos precipitan en orinas alcalinas o neutras dando lugar a un sedimento blanco que desaparece con el agregado de ácido acético.

Los leucocitos pueden causar turbidez blanquecina que permanece después de la acidificación y dan una masa gelatinosa con una solución fuerte de hidróxido de sodio (Reacción de Donne).

## SEDIMENTO URINARIO

En orinas normales el sedimento es escaso o nulo. En condiciones patológicas puede variar en cantidad y calidad, según los elementos presentes en suspensión. Se lo informa como escaso, regular o abundante (ver en examen microscópico).

## OLOR

En condiciones normales la orina tiene un leve olor aromático por la presencia de ácidos orgánicos volátiles. El espécimen puede adquirir un olor característico según el régimen alimenticio, como la ingestión de espárragos, con ciertos medicamentos o componentes patológicos. Ejemplos: olores amoniacaes hacen pensar en la presencia de cistitis provocadas por *Micrococcus ureae* que desdobla la urea para formar amoniaco. El

olor frutado es típico en las cetoacidosis diabéticas por cetonuria. La falta de olor en la orina de los pacientes con fallo renal agudo sugiere necrosis tubular aguda.

### ESPUMA

La espuma obtenida por agitación de la orina es normalmente blanca pero fugaz, persistente cuando contiene albúmina y/o sales biliares, y se tiñe de amarillo en presencia de pigmentos biliares.

### VOLUMEN

El volumen normal eliminado por un adulto sano en 24 h varía entre 1000 y 1600 mL y depende de diversos factores como: sexo, ingesta de líquidos, temperatura ambiente, actividad física, etc. En la mujer el volumen de orina es algo menor que el hombre, mientras que el niño en relación con su peso, excreta una cantidad bastante más elevada.

En condiciones fisiológicas o patológicas, el volumen de orina eliminada puede aumentar (poliuria), disminuir (oliguria, volumen menor de 500 mL/24h), o estar ausente (anuria).

## EXAMEN QUÍMICO

### Tiras reactivas diagnósticas

La base de casi todos los análisis de orina es la tira reactiva de inmersión que es una prueba de diagnóstico *in vitro*. Consiste en una tira de plástico a la que se fija una o más almohadillas que están impregnadas en solución reguladora (*buffer*) y varios indicadores químicos desecados. Cuando se humedece en la orina, cada una de estas se convierte en un medio químico en miniatura que responde a la presencia de compuestos químicos específicos presentes en la muestra (Figura 1). Los resultados se obtienen directamente por comparación con la carta de colores impresa en el rótulo del envase.

Las tiras proporcionan información sobre el estado metabólico de carbohidratos, funcionamiento de los riñones e hígado, el balance acido-base y presencia de bacterias del paciente. Los parámetros que se pueden evaluar son: Glucosa, Bilirrubina, Cetona (ácido acetoácido), densidad, sangre, pH, proteínas, urobilinógeno, nitritos y leucocitos en la orina. Tienen una sensibilidad/especificidad alrededor del 95%. Estos parámetros o las reacciones químicas pueden variar según la marca comercial.

#### Conservación de las tiras:

- Proteger de la humedad y calor excesivo.
- Preservar en su envase en un lugar fresco y seco, pero NO en la heladera.

- Comprobar en cada uso que no se ha producido decoloración o coloración excesiva, hecho que indicaría una pérdida de reactividad.

En un laboratorio clínico se debe considerar a la tira reactiva como un dispositivo de selección primaria que junto con el examen visual, permiten separar las muestras anormales de las normales. Las anomalías deben dilucidarse en forma más completa usando pruebas de seguimiento y confirmación.



Figura 1: Tiras reactivas de orina (<https://sp.depositphotos.com>)

## PRUEBAS QUÍMICAS DE LAS TIRAS REACTIVAS EN ORINA

La orina normal de un adulto sometido a dieta mixta tiene un pH alrededor de 6 (ácido) que corresponde a una excreción entre 50-100 mEq de iones hidrógenos en 24 h. En individuos sanos, el pH de la orina puede variar entre 4,6 y 8.

Los riñones y los pulmones trabajan juntos para mantener un equilibrio ácido-base. Los pulmones excretan dióxido de carbono, mientras que la contribución renal es la de generar bicarbonato y secretar iones amonio. Las células tubulares intercambian iones hidrógeno por iones sodio ( $\text{Na}^+$ ) en el filtrado glomerular. La actividad metabólica corporal produce ácidos no volátiles como sulfúrico, fosfórico y clorhídrico y pequeñas cantidades de ácidos orgánicos (láctico, pirúvico y cítrico). Todos ellos son excretados en la orina como sales de sodio, potasio calcio y amonio. Esta excreción selectiva de cationes, regulada por el riñón, tiene como objeto mantener el equilibrio ácido-base a través de la reabsorción de una cantidad variable de iones sodio a nivel tubular y la secreción de hidrogeniones a la luz

de éstos. Por lo tanto, cabe destacar que la acidez urinaria aumenta a medida que el sodio es retenido por el organismo.

Orina Ácida: se observa en dieta rica en ingesta de carne, acidificación terapéutica de la orina en el tratamiento de algunos cálculos (cloruro de amonio, metionina, otros), en las acidosis metabólicas (cetoacidosis diabética) o acidosis respiratoria (enfisema), por vómito prolongado, uso de diuréticos, estados de hiponutrición, en diarreas graves, fiebre, uricemia y en algunas enfermedades metabólicas (fenilcetonuria, alcaptonuria).

Orina Alcalina: se observa en dieta rica en ciertas frutas y verduras, especialmente cítricos. Un pH francamente alcalino se presenta en afecciones de las vías urinarias (cistitis, pielonefritis, especialmente por *Proteus*). En alcalosis metabólica (ingesta excesiva de bicarbonato, vómitos) y alcalosis respiratoria (síndrome de hiperventilación). En acidosis renal tubular, la orina es relativamente alcalina, y el pH no puede bajar de 6 ó 6,5, incluso bajo sobrecarga ácida del paciente, porque el mecanismo de acidificación renal se encuentra alterado.

### **Detección de sustancias en orina por tiras reactivas:**

#### **- pH**

- En tira reactiva: la determinación de pH se basa en el principio de doble indicador: Rojo de metilo y Azul de bromo timol. Éstos tienen una gama de colores que va del naranja al azul, pasando por el amarillo y el verde, lo que permite estimar los valores de pH en el rango de 5 a 9.  
Los colores van del anaranjado al amarillo entre 5 a 6,5 ácidos, y del verde al azul pH 7 a 8,5 alcalino.
- Si no se dispone de tiras reactivas se puede medir el pH urinario con un peachímetro o preparar un indicador líquido que contiene rojo de metilo, azul de bromo timol, OHNa 0,1N y agua destilada (Indicador de Guillaumin).

#### **- Densidad**

Es un parámetro sumamente útil, que indica la cantidad de compuestos sólidos disueltos en el volumen total de la muestra. La densidad refleja la capacidad del riñón de concentrar o diluir la orina. A mayor densidad, mayor cantidad de solutos y viceversa.

La densidad de la orina de una persona sana sometida a una alimentación mixta varía entre 1.016 y 1.022 (rangos entre 1.015 y 1.030). La urea, cloruro de sodio, sulfatos y fosfatos son los principales contribuyentes a la densidad de la orina normal.

## Métodos

Para medir la densidad se dispone de tiras reactivas y del densímetro.

**a-** Tira reactiva: es un método indirecto de medida de la densidad. En el área reactiva para densidad están presentes polielectrolitos pre-tratados, indicador de pH y buffer. Frente a sustancias iónicas los polielectrolitos se disocian liberando protones que hacen virar al indicador. El color obtenido se compara con escala que da los valores de densidad.

**b-** Determinación de la densidad por densímetro: se coloca la orina en una probeta de 100 mL, y se introduce el densímetro girándolo como trompo. Antes de que se detenga se debe leer la densidad en el vástago, en la parte superior del menisco que se forma en contacto con la orina.

Para comprobar que el densímetro está perfectamente graduado, se mide la densidad del agua destilada, que debe ser de  $1.000 \text{ g/dm}^3$  a  $22^\circ\text{C}$ . En caso contrario se corrige,  $1^\circ\text{C}$  del densímetro por cada  $3^\circ\text{C}$  de diferencia.

En condiciones patológicas, la densidad puede variar dentro de límites más amplios respecto al estado fisiológicos (1.001 a 1.060). La glucosa y las proteínas urinarias son motivos de incrementos importantes en la densidad. Por ello, deben aplicarse factores de corrección que corresponden a 0,004 por cada g/L de glucosa y 0,003 por cada g/L de proteína. Los valores obtenidos en cada caso se restarán a la densidad medida (densidad bruta) para obtener la corregida (densidad neta).

La densidad se encuentra baja en nefritis crónica intersticial, la diabetes insípida y en muchos trastornos funcionales de origen nervioso. Se observa una densidad alta en los procesos febriles, en la nefritis parenquimatosa y en la diabetes tipo 2.

## **- Proteínas**

En condiciones normales el contenido en proteínas excretadas en la orina varía entre 100-150 mg/24 h en el adulto dependiendo del volumen de orina. Alrededor de un tercio es albúmina y el resto corresponde a proteínas de origen tubular (mucoproteínas de Tamm-Horsfall) y pequeñas cantidades de  $\beta$ -2 microglobulina y de hormonas peptídicas que son filtradas en el glomérulo y no se reabsorben en los túbulos. La presencia de proteínas en orina se designa como *proteinuria* y constituye el signo más frecuente de enfermedad renal. Generalmente con los métodos convencionales no se detectan proteínas salvo en situaciones de anormalidad.

- Proteinuria severa (mayor de 4 g/24 h) características del síndrome nefrótico, aunque también puede observarse en las glomerulonefritis, amiloidosis y congestión venosa renal severa.

- Proteinuria moderada (0,5 a 4 g/24 h) predominan en glomerulonefritis crónicas, nefrosclerosis, pielonefritis con hipertensión, mieloma múltiple y otras neuropatías diversas.
- Proteinuria mínima (menor de 0,5 g/24 h) se puede observar en la pielonefritis crónica y en las fases inactivas de las enfermedades glomerulares.

### Métodos

Entre los métodos habituales de detección se encuentran las pruebas cualitativas y semicuantitativas con las tiras reactivas colorimétricas y las pruebas de precipitación (Reacción de Kingsbury).

**a-** Tira reactiva: esta prueba se basa en el “Error Proteico de los Indicadores de pH”. Dado que las proteínas están cargadas a pH fisiológico, su presencia se hará evidente en los cambios de pH. Existen tiras reactivas comerciales, que usan como indicador el azul de tetrabromofenol en solución reguladora a pH 3 y puede cambiar de amarillo al azul grisáceo si se detecta albúmina. La intensidad del color se compara con la cartilla de colores suministrada por el fabricante. Una prueba negativa con la tira, no descarta la presencia de proteínas porque detecta solo albúmina.

Se informa:

<b>TRAZAS</b>	5 a 20 mg/dL
<b>+</b>	30 mg/dL
<b>++</b>	100 mg/dL
<b>+++</b>	200 mg/dL
<b>++++</b>	Más de 200 mg/dL

### **b-** Reacción de Kingsbury:

Es un método que usa el ácido sulfosalicílico al 3% en agua destilada para la precipitación de proteínas. Este procedimiento determina todas las proteínas: albúmina, globulinas, glucoproteínas y proteína de Bence Jones. Sensibilidad: 5-10 mg/dL.

Consiste en centrifugar 10 mL de orina, se extrae 1 mL de sobrenadante, se agregan 3 mL de ácido Sulfosalicílico al 3% y se lee la turbidez a los 5 min. Esta se compara con una escala turbidimétrica, constituida por una serie de tubos que equivalen a una concentración de proteína conocidas, que va desde 0,1g/L a 1 g/L (escala de Mc Farlan).

### Ventaja y Desventaja de los Métodos

La determinación mediante tiras reactivas es rápida y sencilla. Sin embargo, no es muy exacta, en primer lugar porque suele hacerse en la orina de una sola micción, cuando es preferible expresar la proteinuria en 24 h, y además porque depende de factores tales

como el pH, la concentración de la orina o el tipo de proteína presente. Una orina muy alcalina o muy concentrada puede dar un falso positivo. La sensibilidad es mayor para la albúmina, intermedia para globulinas y hemoglobina (que cuenta con un sector específico en la mayoría de las tiras) y baja o nula para las cadenas ligeras de inmunoglobulinas (proteinuria de Bence-Jones) y mucoproteínas, por lo que pueden dar un falso negativo. Métodos más exactos son la turbidimetría con ácido sulfosalicílico o la colorimetría con rojo de pirogalol. Estas técnicas se utilizan si se sospecha que hay un falso positivo.

#### **c- Proteínas de Bence Jones (PBJ):**

Esta proteína de bajo peso molecular está formada por dímeros de cadenas livianas procedentes de las inmunoglobulinas que se filtra con facilidad a través de los glomérulos sanos. La presencia persistente de PBJ causa lesiones en las membranas del glomerular aumentando su permeabilidad.

#### Método

La determinación de PBJ se basa en las propiedades de solubilidad de esta proteína, ya que precipita entre 40 °C y 60 °C y solubiliza a 100 °C. Si se deja enfriar, el precipitado reaparecerá a 60 °C y volverá a disolverse por debajo de los 40 °C. El método más utilizado para su detección en orina es la electroforesis de proteínas.

El análisis electroforético de las proteínas, previa concentración de la orina, muestra la presencia normal de todas las proteínas séricas excepto la alfa 1-lipoproteína, beta lipoproteína y la alfa 2-macroglobulina e IgM. También algunas proteínas de alto peso molecular ausentes en plasma, tales como la proteína de Tamm-Horsfall secretada por células del asa de Henle y del túbulo contorneado distal.

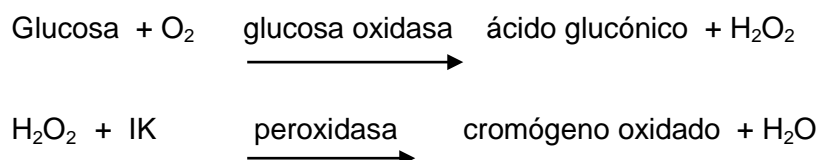
#### **- Glucosa**

La presencia de glucosa en orina se denomina glucosuria. Normalmente, se elimina por orina cantidades de glucosa que no son detectables por métodos habituales. La glucosa es una sustancia con umbral renal, es decir, que resulta totalmente absorbida por los túbulos renales cuando su concentración sanguínea se encuentra dentro de los límites normales. En contraste, si los niveles circulantes de glucosa exceden de 180 a 200 mg/dL (hiperglucemia), grandes cantidades de este monosacárido pueden aparecer en orina. La xilosa, la fructosa, la galactosa y la glucosa utilizan el mismo mecanismo de transporte tubular. Causas de glucosuria: diabetes mellitus, trastornos pituitarios y adrenales (acromegalia, síndrome de Cushing), otros.



### Método

Tira reactiva: es un método específico para glucosa y es semicuantitativa. No reacciona con lactosa, galactosa, fructosa. Las tiras están impregnadas con la enzima glucosa oxidasa (GOD) y peroxidasa (POD) que reacciona con la glucosa de la orina dando una variedad de colores que van del verde al marrón según la concentración del monosacárido. Las tiras reactivas difieren en el cromógeno utilizado como ioduro de potasio. La reacción completa se expresa como sigue:



La cuantificación de la glucosuria se realiza por métodos enzimáticos o por métodos basados en la reducción del ión cúprico (Técnica de Fehling).

### **- Cetonas**

Siempre que hay un defecto en el metabolismo o la absorción de los carbohidratos o una cantidad inadecuada de carbohidratos en la dieta, el cuerpo lo compensa metabolizando mayores cantidades de ácidos grasos. Cuando este aumento es grande, aparece en la sangre cuerpos cetónicos, producto del metabolismo incompleto de los lípidos, que son excretados por la orina, y son tres: ácido acetoacético, acetona y ácido  $\beta$ -hidroxibutírico.

La cetonuria (cuerpos cetónicos en orina) se da en situaciones de ayuno prolongado y se ve facilitada por la existencia de vómitos, especialmente en niños pequeños. En un diabético, la cetonuria indica un control metabólico deficiente y es anuncio de una grave complicación, el coma cetoacidótico.

### Métodos

**a-** Tira reactiva: se basa en la reacción de ácido acetoacético de la orina con nitroprusiato. El color resultante va desde tostado, cuando no hay reacción, a distintos tonos de púrpura para reacciones positivas. El área reactiva detecta entre 5 y 10 mg ácido acetoacético/dL y no reacciona con acetona y ácido  $\beta$ -hidroxibutírico.

**b-** Técnica de Imbert: se basa en la formación de un cromógeno rojo violáceo por reacción de la acetona y el ácido acetoacético urinario con el nitroprusiato de sodio en presencia de amoníaco.

### - Bilirrubina

La bilirrubina se transporta en la sangre unida a albúmina (bilirrubina no conjugada) y en el hígado se conjuga con el ácido glucurónico y luego lo excreta al tracto biliar. Cuando se observa un incremento de bilirrubina conjugada en la orina generalmente indica que existe una obstrucción del conducto biliar por cálculos o bien obstrucción intrahepática. La orina normal no contiene bilirrubina detectable.

#### Método

- Tira Reactiva: la reacción consiste en el acoplamiento de la bilirrubina con 2-4 dicloroanilina diazotada (sal de diazonio) en medio ácido, con un cambio de color de crema a marrón. Los resultados se informan como positivo o negativo, en caso positivo se informará en cruces (+ a ++++).

### - Urobilinógeno

El urobilinógeno se forma en el intestino, las enzimas bacterianas convierten la bilirrubina en urobilinógeno (pigmento incoloro). El 10 al 15% del pigmento es reabsorbido, pasa al torrente sanguíneo, retorna al hígado y es re-excretado al intestino. Una pequeña cantidad de este urobilinógeno se excreta también por los riñones. En la orina existe un nivel normal de 1 a 4 mg/24h. La determinación de esta prueba es importante para conocer el estado de la función hepática.

#### Método

- Tira reactiva: la prueba está basada en la reacción de unión de una sal de diazonio con el urobilinógeno urinario en un medio ácido. El color vira del rosa pálido al rosa intenso.

### - Sangre

La observación del sedimento en la muestra de orina centrifugada orientará el diagnóstico, así la presencia de eritrocitos indica hematuria; en caso contrario deberá realizarse el diagnóstico diferencial entre hemoglobinuria y mioglobinuria. Los hematíes intactos, la hemoglobina y la mioglobina libres se determinan por tiras reactivas. Puede observarse falsos positivos en presencia de agentes oxidantes, peroxidasa bacteriana y soluciones de hipoclorito y falsos negativos con agentes reductores como vitamina C.

El procedimiento de detección de sangre oculta en la tira se basa en la liberación de oxígeno a partir de un peróxido debido a la actividad peroxidasa del grupo hemo en la hemoglobina libre, los eritrocitos lisados y la mioglobina, que catalizan la oxidación de un indicador por la acción de un peróxido orgánico. Esta prueba está basada en la actividad de pseudoperoxidasa de la hemoglobina, la cual cataliza la reacción de 3,3',5,5'-

tetrametilbencidina con hidroperóxido orgánico tamponado. El color resultante varía desde verdoso-amarillento, pasando por verde azulado, hasta azul oscuro. Los resultados se informan en una escala que va desde trazas hasta 3+ o gran cantidad.

## PRUEBAS INDIRECTAS PARA INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO POR TIRAS REACTIVAS

### - Nitritos

La bacteriuria se determina por un método químico de *screening*, que se efectúa con la primera orina de la mañana mediante tiras reactivas y se basa en la reducción de nitratos a nitritos por la acción enzimática de determinadas bacterias (gram negativas). Esta prueba es bastante específica pero poco sensible (60% de sensibilidad). La mayoría de los microorganismos reducen los nitratos urinarios a nitritos, con excepción de *Enterococcus sp*, *S. saprophyticus*, *Acinetobacter* y *Candida spp*. Por lo tanto es imprescindible analizar el sedimento urinario (véase más adelante).

#### Método

Tira reactiva: esta prueba está basada en la reacción de ácido p-arsanílico y nitrito, derivado del nitrato de la dieta en presencia de bacterias de la orina, para formar un compuesto de diazonio. Este compuesto reacciona con N-(1-naftil) etilendiamina en un medio ácido. La tira se lee a los 40 segundos. Cualquier grado de color rosa uniforme debe interpretarse como prueba de nitrito positiva y sugiere la presencia de  $10^5$  o más organismos por mL de orina.

### - Leucocitos

La esterasa de los neutrófilos se detecta en orina mediante tiras reactivas que ponen de manifiesto de forma indirecta, pero sensible, la existencia de piuria siempre que la leucocituria supere el millón de células por minuto. Las esterasas escinden un derivado del éster pirazol aminoácido para liberar un derivado de hidroxipirazol que luego con la sal de diazonio determina un producto violeta. Un resultado positivo debe complementarse con el examen del sedimento y con la realización de un urocultivo.

### **Falsos positivos y negativos de las tiras reactivas**

En general, los factores más comunes que pueden alterar los resultados de las tiras reactivas son los siguientes: valores extremos de pH y densidad urinaria, oxidantes, antibióticos, ácido ascórbico, proteinuria, antisépticos y jabones.

## CONTROL DE CALIDAD

Los resultados obtenidos con las tiras reactivas pueden ser confirmados utilizando muestras control positivas o negativas.

## EXAMEN MICROSCÓPICO

### SEDIMENTO URINARIO

El examen microscópico de la orina junto con el método de análisis químico de tiras permite la detección de enfermedades renales y del tracto urinario.

Los sedimentos de la orina previamente centrifugada contienen los materiales insolubles que se acumulan en la orina después de la filtración glomerular y durante el paso del fluido por los túbulos renales y el tracto urinario inferior. Los elementos celulares proceden de dos fuentes: 1) células descamadas/exfoliadas del revestimiento epitelial del riñón y del tracto urinario inferior y 2) células como leucocitos y eritrocitos. Se pueden observar cilindros celulares y no celulares y cristales de diferente naturaleza. Los organismos (bacterias, hongos, células con inclusiones virales y parásitos) y las células neoplásicas son elementos extraños en la orina, salvo en situaciones patológicas (Figura 2).

#### 1- Células Epiteliales

Células epiteliales escamosas: se observan frecuentemente en la orina normal. Son células planas y alargada, grandes, con citoplasma abundante y transparente y núcleos redondos y centrales. Su origen puede ser uretral o vaginal.

Células epiteliales de transición: revisten el tracto urinario desde la pelvis renal al tercio inferior de la uretra. Estas células son más pequeñas que las escamosas (40-200  $\mu\text{m}$ ). Son redondas o con forma de pera, con un núcleo esférico y central. En la orina está presente este tipo celular y rara vez tienen significación patológica.

Células del epitelio tubular renal: son células que se identifican por su forma cúbica o poligonal y su núcleo grande y algo excéntrico. Un número elevado de estas células sugiere daño tubular, y se encuentran en enfermedades como necrosis tubular, pielonefritis, rechazo del riñón transplantado, etc. Existen un tipo de células redondas con gran refringencia por su alto contenido en grasa que se denominan cuerpos ovals grasos.

## 2- Leucocitos

Tienen un diámetro de 10 a 12  $\mu$ , de forma esférica, color gris oscuro, aparecen en forma aislada, la mayoría son neutrófilos y presentan gránulos característicos. Cuando los leucocitos aumentan su volumen en orinas diluidas, sus gránulos pueden presentar movimientos brownianos y se denominan “células centellantes”. En orinas normales se observan entre 4 a 5 leucocitos por campo.

Los piocitos son leucocitos que experimentan una intensa degradación que ocurre en procesos inflamatorios e infecciosos, forman cúmulos y constituyen el glóbulo de pus. Pueden aparecer en glomerulonefritis aguda, pielonefritis, cistitis, uretritis y también por contaminación del flujo vaginal.

## 3- Hematíes (eritrocitos)

Los eritrocitos se encuentran en la orina normal en pequeño número (0 a 2 cél/campo). La presencia de un aumento de estas células en la orina puede ser indicativa de alteraciones del tracto urinario y sistémicas (Hematuria). En orinas diluidas los eritrocitos aumentan su volumen y se lisan liberando su contenido de hemoglobina en la orina. En las orinas hipertónicas, los hematíes se tornan dentados (con bordes arrugados) por pérdidas de líquidos. Si hay lesión o ruptura de los vasos sanguíneos en el riñón o en el tracto urinario se produce la liberación de los hematíes hacia la orina. Se puede observar hematuria en la litiasis o tuberculosis renal, glomerulonefritis, lupus nefrítico, infecciones agudas, etc.

## 4- Cilindros

Los cilindros se forman en el túbulo del riñón por precipitación o gelificación de la glucoproteína Tamm-Horsfall, secretada por la parte gruesa del asa de Henle ascendente. Esta proteína forma la matriz de todos los cilindros formando un entramado de fibrillas que pueden atrapar cualquier elemento presente en el filtrado tubular incluyendo células u otro material granular.

De acuerdo con el origen y la composición de los cilindros se pueden clasificar en:

- Cilindros Hialinos: Son incoloros, homogéneos, transparentes, lados paralelos y extremos redondeados. Pueden observarse cilindros hialino en la enfermedad renal más leve, no se asocian con ninguna enfermedad en particular, en la orina normal pueden encontrarse cilindros hialinos en pequeña cantidad, aumentan después del ejercicio físico o en caso de deshidratación fisiológica.
- Cilindros Epiteliales: Se forman como consecuencia del éstasis urinario y de la descamación de las células del epitelio tubular. Su observación en orina es rara salvo en enfermedades que afectan a los túbulos renales, como la exposición a

citomegalovirus o virus de la hepatitis que provocan degeneración o necrosis tubular. Estos cilindros también pueden aparecer en la enfermedad renal crónica grave, en la que el daño tubular acompaña al glomerular.

- Cilindros Leucocitarios: Se observan en infección renal y en procesos inflamatorios de causas no infecciosa, como en: pielonefritis aguda, nefritis intersticial, nefritis lúpica y enfermedad glomerular.
- Cilindros Eritrocitarios: Contienen hematíes más o menos alterados e indican siempre hemorragia a nivel de los tubos, como se observa en la nefritis aguda o en los brotes evolutivos de las nefritis crónicas.
- Cilindros Granulosos: Los cilindros granulosos son en realidad una variante de los hialinos, en los cuales en sustrato hialino se halla impregnado con granulaciones. Los cilindros que presentan granulaciones finas son más cortos, anchos y opacos que los hialinos, y se distinguen fácilmente; su color es grisáceo o amarillo pálido. Los cilindros de granulaciones gruesas son más irregulares y más teñidos que los anteriores, en general de color pardo por impregnación de pigmento hemático y están presentes en nefritis aguda.
- Cilindros Céreos: Al igual que los cilindros hialinos son homogéneos. Por lo general contienen algunas granulaciones o elementos celulares; son más irregulares que los hialinos, de extremos quebrados e irregulares, con aspecto de segmentación; son incoloros o grisáceos, opacos como molde de parafina, su sustancia presenta a veces la reacción de los compuestos amiloideos. Se los encuentra en casos avanzados de nefritis, siendo su presencia de mal pronóstico y predominan en los casos de degeneración amiloidea del riñón.
- Cilindros Grasos: Pueden observarse a menudo pequeñas gotas de grasas en cualquier variedad de cilindros. Estas gotas se identifican con la coloración con el ácido ósmico o Sudan III. Las granulaciones y gotas de grasas observadas en los cilindros son generalmente productos de degradación epitelial.

Los cilindros de granulaciones finas asociados a los hialinos son característicos de las alteraciones poco comprometidas del epitelio. Los de granulaciones gruesas y los grasos implican una alteración parenquimatosa profunda.

## 5- Cristales

Orinas Ácidas:

- Uratos y ácido úrico: se forman al precipitar en las orinas concentradas y fuertemente ácidas, el sedimento amarillento o rojizo visible microscópicamente, y dominados por su aspecto “arenilla o polvo de ladrillo”; frecuentemente impiden por su abundancia la

observación microscópica del sedimento orgánico. Los uratos pueden eliminarse calentando ligeramente la orina a baño María, y el ácido úrico, por el agregado de unas gotas de hidróxido de sodio diluida. Morfológicamente, el ácido úrico es polimorfo, presentándose en cristales de forma y tamaño variados; las formas más comunes son prismas y rombos agrupados formando “rosetas” o aislados, formas en “huso”; su color varía de un amarillo al pardo rojizo, y es debida a la impregnación por los pigmentos urinarios, especialmente la uroeritrina. Los uratos amorfos (generalmente de sodio y potasio) se presentan como granulaciones finas más o menos teñidas según la concentración urinaria.

- Oxalato de Calcio: Se presentan formando cristales incoloros, brillantes, octaédricos, con forma de “sobre”, varían de tamaño y también existen algunas formas esféricas, pudiendo ser confundidas con hematíes o glóbulos de grasa. Son insolubles en ácido acético o hidróxido de sodio, solubles en ácido clorhídrico concentrado. Se encuentran en la orina después de la ingestión de ciertos vegetales ricos en ácido oxálico (tomate, espinaca, espárragos), carecen en general de valor semiológico, salvo en lo referente a su tendencia a formar cálculos.
- Leucina y Tirosina: Estos cristales se encuentran en escasas oportunidades, derivados de la molécula proteica. Indican por lo general procesos graves de desintegración tisular, aparecen comúnmente en los casos de degradación grasa intensa del hígado, como se observa en la atrofia amarilla aguda, y en la intoxicación con el fósforo; estos cristales precipitan solo cuando se encuentran en gran cantidad, de lo contrario es necesario concentrar la orina en pequeño volumen. La leucina aparece generalmente al estado de esfera de aspecto aceitoso, de color amarillento, con estrías radiadas y concéntricas; la tirosina cristaliza en agujas finas agrupada en forma radiada o en manojos.
- Cistina: los cristales de cistina (producto intermedio del metabolismo proteico) son incoloros, brillantes de forma hexagonal, gruesos y bordes bien netos. La cistina se encuentra en orina en muy baja cantidad y precipita solo cuando incrementa en los casos de “cistinuria”, dando origen a la formación de cálculos vesicales o renales.
- Glóbulos de grasa: se presentan como esferas de tamaño diverso, muy refringentes, identificables por teñirse de negro con el ácido ósmico, de amarillo o rojo por el Sudán III. Generalmente su presencia en la orina se debe a factores extraños, como frascos sucios, aceites de los catéteres, contaminación rectal por la ingesta de grandes cantidades de aceite de bacalao o de parafina, etc. Patológicamente, en la degradación grasa del riñón, la intoxicación por el fósforo y en la nefritis parenquimatosa crónica, pueden hallarse glóbulos de grasa libres o formando parte de células o cilindros; en los corpúsculos de pus, y en general en toda célula en

degradación. En los casos raros de quiluria (filariosis), la cantidad de los glóbulos de grasa presentes pueden comunicar a la orina un aspecto lechoso.

#### Orinas Alcalinas:

- Fosfato: los fosfatos precipitan generalmente en orinas alcalinas, también pueden encontrarse en orinas anfóteras o débilmente ácidas; sus formas más frecuentes son cristales de fosfato amoníaco-magnésico o fosfato de calcio, y granulaciones amorfas de fosfatos térreos; son todos solubles en ácido acético.
  - a- Fosfato amónico-magnésico: comúnmente llamados fosfatos triples, son cristales incoloros, cuya forma siempre presenta alguna variante del prisma, siendo la forma clásica la de “tapa de ataúd”; cuando el borde longitudinal superior es algo corto, pueden asemejar a los cristales de oxalato de calcio, de los cuales es fácil la diferenciación por su escaso brillo y su solubilidad en ácido acético.
  - b- Fosfatos amorfos: los fosfatos térreos precipitan en casi todas las orinas alcalinas y anfóteras, como un sedimento blanco, amorfo, fácilmente confundible con pus. Microscópicamente se presentan como granulaciones incoloras, se diferencian de los uratos por el color, la solubilidad en ácido acético y la reacción de la orina.
  - c- Fosfato de Calcio: precipitan principalmente en orinas anfóteras débilmente ácidas o débilmente alcalinas, en forma de prisma agrupados en “rosetas” o “estrellas”, pueden confundirse con cristales de tirosina, ácido hipúrico o sulfato de calcio, de los cuales se diferencian por su solubilidad en ácido acético. Por lo general los diversos tipos de fosfatos precipitan conjuntamente pueden indicar un aumento del ácido fosfórico, pero generalmente indican que la orina se está transformando en alcalina.

Otros cristales solubles en ácido acético son los de carbonato de calcio o de urato de amonio. Dado su escaso valor semiológico se omite su descripción.



### SEDIMENTO URINARIO

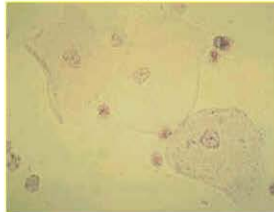
Glóbulos rojos



Leucocitos



Células epiteliales

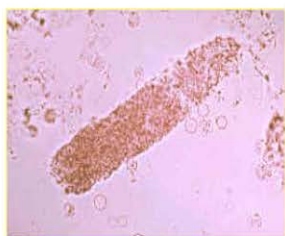


### CILINDROS

C. Epiteliales



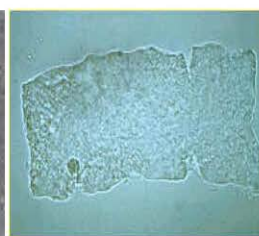
C. Eritrocitarios



C. Leucocitarios

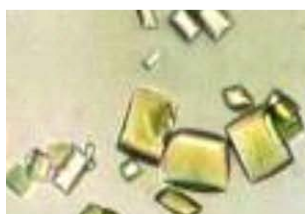


C. Céreos



### CRISTALES DE ORINAS ACIDAS

Cr. Ácido úrico



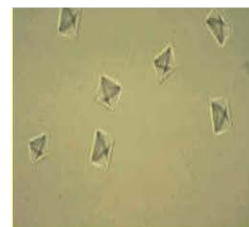
Cr. Uratos amorfos



Biouratos

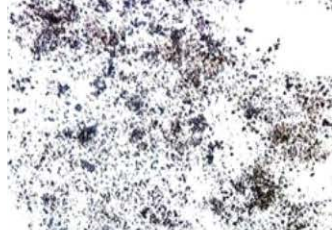


Oxalatos



### CRISTALES DE ORINAS ALCALINAS

Fosfatos triples (magnesio amonio), fosfatos amorfos

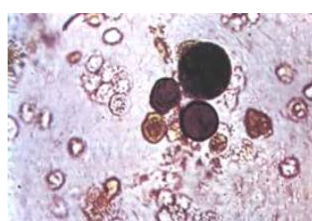


### CRISTALES PATOLÓGICOS

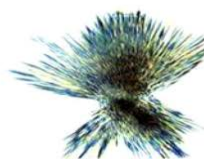
**Cistina**



**Leucina**

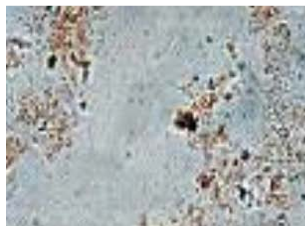


**Tirosina**



### BACTERIAS, PARASITOS Y HONGOS

**Bacterias**



**Bacterias**



**Trichomonas**



**Levaduras**



Figura 2. Elementos que pueden observarse en el sedimento urinario

### **Desechos**

Un conjunto de materiales no significativos pueden formar el sedimento urinario. Generalmente se deben a material de vejiga o uretra, pero a veces se deben a contaminación del vaso de recolección. Pelos, fibras diversas y restos de talcos son comunes. No tienen importancia excepto cuando oscurecen el campo. Su presencia puede sugerir una recolección defectuosa. No deben citarse, excepto si no hay ningún otro hallazgo.

### **CUANTIFICACIÓN DE ELEMENTOS CELULARES DE LA ORINA**

#### **Recuento de Addis**

El recuento de Addis es la cuantificación del sedimento urinario. El periodo de recolección de orina es de 12 h, previa restricción en la ingesta de líquidos (dieta seca).

**Significado clínico:** El aumento de leucocitos, hematíes y cilindros con proteinuria reconoce lesión renal y no alteración funcional. Es útil para valorar nefritis o una pielonefritis.

Valor de referencia	Para recolección de 12 h
Leucocitos:	hasta 1.000.000
Hematíes:	0- 350.000
Cilindros:	0- 5.000

### **SEDIMENTO URINARIO AUTOMATIZADO**

El examen microscópico es considerado como el método de referencia sin embargo este procedimiento requiere una serie de etapas previas a la observación, ya que en las mismas se pueden producir pérdidas y deterioro de elementos. Si estos procedimientos se realizan en forma manual y/o por diferentes operadores los porcentajes de inexactitud e imprecisión pueden no estar bajo los límites de calidad aceptables. Es por ello que se valoriza la incorporación de un sistema automatizado que estandariza todas las etapas previas a la observación del sedimento.

Las dos líneas tecnológicas más difundidas y más implementadas actualmente son la *microscopía automática* y la *citometría de flujo*.

#### **Microscopía automática**

Esta tecnología está representada por dos tipos de sistemas:

**1-** Un sistema de captura de imágenes microscópicas y su clasificación mediante un sistema informático, que lleva implementado un banco de imágenes que sirven como diccionario visual de referencia para dicha clasificación.

La muestra de orina es aspirada directamente del tubo primario por una pipeta que a su vez la homogeneiza, se mezcla con un diluyente y se forma una película plana que permite a las células pasar ordenadamente y de a una por vez por una celda de flujo. Esta celda es iluminada con una luz estroboscópica (varios flashes/segundo). Las imágenes son captadas por un objetivo microscópico acoplado a un ocular y a su vez, a una cámara de vídeo digital que capta muchos fotogramas por muestra, cada uno en una pequeña porción de orina. Estas imágenes son clasificadas según su tamaño, contraste, forma y textura, y comparadas con una base de datos instalada en una PC. Las imágenes pueden visualizarse en un monitor para su comprobación y verificación visual, permitiendo al usuario seleccionar y guardar imágenes (Figura 3).

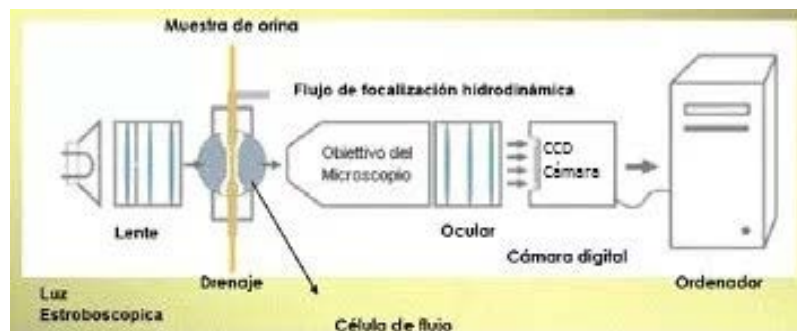


Figura 3. Microscopía automática (<https://notiwiener.net/2016/05/sedimento-urinario-automatizado>).

Los resultados pueden informarse como: partículas por  $\mu\text{L}$ , por campo, como rangos, o con adjetivos como “algunos”, “moderados”, “abundantes”.

**2-** Un sistema que se basa en el estudio microscópico automático de una muestra centrifugada de orina. La muestra es aspirada del tubo primario, una porción de ésta es transferida a una cubeta y centrifugada durante 10 minutos; una cámara digital acoplada a un microscopio de campo brillante, capta imágenes del sedimento en diferentes localizaciones del fondo de la cubeta, y dichas imágenes se visualizan en un monitor con una apariencia similar a la de un campo microscópico de 400x. Todo el proceso está controlado por una PC que dispone de un software de alta calidad, capaz de identificar y clasificar las partículas de la orina. Los resultados pueden expresarse por campo, por unidad de volumen o en cruces (1+, 2+ y 3+).

Ambos equipos (1 y 2) pueden conectarse a un lector automático de tiras.

### Citometría de flujo

Se basa en el recuento y clasificación de los elementos formes, por sus propiedades ópticas de dispersión de la luz y por su capacidad de emitir radiación fluorescente cuando son teñidos con compuestos fluoróforos.

La muestra de orina sin centrifugar es identificada, aspirada, mezclada y teñida por dos colorantes como polimetinas fluorescentes y, siendo uno de ellos, especial para bacterias que impide que se tiña cualquier otro elemento de la orina. Inmediatamente, la muestra es rodeada por un líquido inmiscible y orientada hidrodinámicamente en una cámara de flujo, circulando a través de ésta a gran velocidad y de manera que las partículas pasen de una en una, obteniendo un mejor recuento e identificación. Las partículas pueden ser iluminadas con un rayo procedente de una fuente de láser de argón (emite radiación azul de una longitud de onda de 488 nm) o por un láser diodo semiconductor (emite radiación roja de 635 nm de longitud de onda). La partícula iluminada puede comportarse de dos

maneras frente a esta radiación: por un lado, es capaz de dispersar dicha luz en todas direcciones, la luz dispersada hacia delante, y/o la luz dispersada lateralmente, es la que se mide (según el equipo); por otro lado, las partículas que se han teñido con los colorantes fluoróforos son capaces de emitir radiación fluorescente de dos longitudes de onda diferentes. La luz dispersa es de suficiente intensidad y es detectada y medida en un fotodetector, mientras que la radiación fluorescente es de baja intensidad y necesita amplificarse en un fotomultiplicador. Ambas señales luminosas son transformadas en impulsos eléctricos y registradas.

Un tercer tipo de medida que puede realizar el aparato es la medida de los cambios de impedancia en la cámara de flujo, ya que por ella circula una corriente eléctrica constante que cambia cuando una partícula circula por ella. Estos cambios de impedancia son transformados en impulsos eléctricos y enviados al microprocesador. Todos estos impulsos eléctricos registrados por el microprocesador son combinados e integrados en una serie de registros gráficos (histogramas y diagramas de dispersión) (Figura 4).

#### **Inconvenientes de la técnica automatizada**

- Requieren una sólida formación en el reconocimiento de imágenes e interpretación de resultados o alarmas.
- Los recuentos correlacionan peor cuando son bajos, cuando hay agrupaciones de estructuras o ante la presencia de levaduras y formas cristalinas.
- Elevado costo económico de consumibles.
- Presentan carencias en la clasificación de algunas estructuras como eritrocitos dismórficos, levaduras, tricomonas, cuerpos ovoides grasos, cilindros e identificación de los distintos cristales, lo que exige la visualización del sedimento manual.

#### **RECORDAR!**

El laboratorio debe seguir las instrucciones de los fabricantes para la manipulación pre-analítica de las muestras de orina, puesta en marcha del equipo, calibración, control de calidad, identificación adecuada de la muestra y procesamiento del equipo en general.

Como con cualquier método de laboratorio clínico automatizado, el laboratorio debe verificar el desempeño, determinando los siguientes parámetros: precisión, veracidad, sensibilidad y especificidad analítica y rango de medida analítica. Se recomienda el uso de las guías del CLSI.

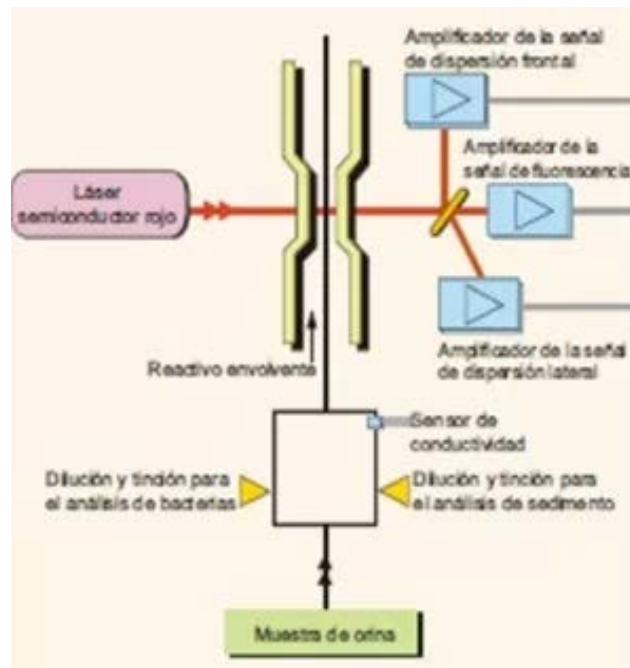


Figura 4. Citometría de flujo (<https://notiwiener.net/2016/05/sedimento-urinario-automatizado>).

## ACTIVIDAD PRÁCTICA

### EXAMEN DE ORINA COMPLETA

#### ▪ PARTE A: ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO

##### MATERIALES

- **Muestra: Orina**
- Tubos de centrifuga
- Centrifuga
- Tiras reactivas
- Densímetro

##### PROCEDIMIENTO

1. Enumerar las muestras. Corroborar rótulo del recipiente con su respectiva orden.
2. En un tubo de centrifuga colocar 10mL de orina.
3. Observar en la orina:
  - a) Color
  - b) Aspecto
  - c) Cantidad de sedimento

#### **Examen Químico por tiras reactivas**

##### PROCEDIMIENTO

1. Homogeneizar la orina y, sin centrifugar, sumergir la tira reactiva.
2. Retirar la tira en forma inmediata. No se debe tocar con las manos las áreas reactivas ni apoyarlas sobre la mesada.
3. Eliminar el exceso de orina y sostenerla en posición horizontal.
4. Comparar las áreas con la carta de colores del envase.
5. Realizar la lectura respetando los tiempos que se indican para cada determinación.

##### INDICAR:

- pH
- Densidad
- Las reacciones que den patológicas

▪ **PARTE B. EXAMEN MICROSCÓPICO DEL SEDIMENTO**

PROCEDIMIENTO:

1. Centrifugar 10 mL de orina, 5 minutos a 2000 rpm.
2. Desechar el sobrenadante con mucho cuidado evitando que arrastre el sedimento.
3. Homogenizar el sedimento.
4. Colocar una gota del mismo en un portaobjetos.
5. Cubrir con un cubreobjeto.
6. Observar el sedimento a 40 X: Observar 10 campos y promediar:
  - Número de células Epiteliales por campo
  - Número de Leucocitos por campo
  - Número de hematíes por campo

Si estuvieran presentes indicar:

- Cilindros: Tipo y cantidad por campo
- Células Redondas por campo
- Cristales: Tipo y cantidad por cruces
- Presencia de bacterias, hongos, parásitos, picocitos. Todos se informan por cruces según la cantidad observada

**- Interpretar el informe del análisis de orina completa llevado a cabo durante el TP.**

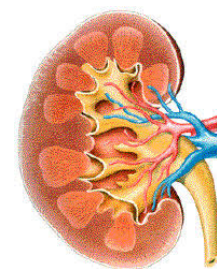
**BIBLIOGRAFÍA**

- ANÁLISIS DE ORINA Y DE LOS LÍQUIDOS CORPORALES. S King Strasinger y M Schaub Di Lorenzo. 6ª Edición. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires 2016.
- MEDICINA DE LABORATORIO. FUNDAMENTOS Y APLICACIONES EN EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO. I Antonozzi y E Gulletta. 1ª Edición. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires 2015.
- EL LABORATORIO EN EL DIAGNOSTICO CLINICO. JB HENRY. 20ª Edición. Ed. Marbán, España 2010.
- EL SEDIMENTO URINARIO. ATLAS. TÉCNICAS DE ESTUDIO. VALORACIÓN. S Althof, J Kindler y R Heintz. 6ª Edición. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires 2003.



## TRABAJO PRÁCTICO N° 4

### EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN RENAL



#### OBJETIVO

- Conocer los fundamentos y realizar las pruebas más utilizadas para evaluar la función renal.

#### INTRODUCCIÓN

El riñón es un órgano muy vascularizado que ejerce funciones de síntesis, metabólicas y de excreción. Si bien su principal función es la depuración de la sangre mediante la formación de orina y la regulación del equilibrio hidroelectrolítico, participa junto con otros órganos en la regulación de la presión arterial, del equilibrio ácido-base, la eritropoyesis, la formación de 1,25-dihidroxitamina D3 y gluconeogénesis.

Las unidades funcionales del riñón son las nefronas, que constituyen un sistema compuesto por vasos sanguíneos, capilares glomerulares y túbulos, donde se desarrollan tres procesos básicos para la formación de la orina:

- La filtración de la sangre que llega a los capilares glomerulares.
- La reabsorción tubular de sustancias que no deben ser eliminadas.
- La secreción tubular de sustancias que pueden sufrir los dos procesos anteriores.

Del equilibrio de estos procesos dependerá que la orina formada presente una composición, densidad, pH y volumen adecuados.

En el laboratorio, la función renal se estudia mediante determinaciones realizadas en muestras de sangre y de orina, junto con la observación al microscopio del sedimento urinario.

#### COMPUESTOS NITROGENADOS NO PROTEICOS

El Nitrógeno (N) junto a otros elementos, como Carbono, Oxígeno e Hidrogeno participan en la constitución de las moléculas orgánicas fundamentales de la materia viva.

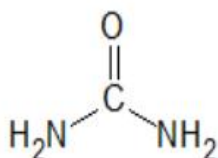
En el ser humano, la fuente principal de sustancias nitrogenadas son las proteínas de la dieta. A diferencia de carbohidratos y grasas no se almacenan como reserva, los niveles en las células se regulan por un balance entre biosíntesis y degradación de proteínas (*recambio normal de proteínas*). Por tanto, un adulto sano que ingiere una dieta variada y completa se encuentra generalmente en situación de “equilibrio nitrogenado”, un estado en el que la cantidad de nitrógeno ingerida cada día es equilibrada por la cantidad excretada

por heces, orina y sudor, sin que se produzca ningún cambio neto en la cantidad de nitrógeno del organismo. Sin embargo, en ciertas condiciones, el organismo se halla en equilibrio nitrogenado negativo o positivo (Cuadro 1).

<b>Cuadro 1. Balance nitrogenado. Situaciones de desequilibrio.</b>	
<b>Equilibrio Nitrogenado Negativo</b>	<b>Equilibrio Nitrogenado Positivo</b>
Inanición Desnutrición proteica Senectud Fiebre severa Diabetes no controlada Neoplasias avanzadas Período post-quirúrgico Traumatismos Quemaduras extensas Sepsis e infecciones	Niñez (crecimiento y desarrollo) Mujeres gestantes Período post-inanición

Los compuestos nitrogenados no proteicos (NPN) se forman en el organismo como resultado del catabolismo de los ácidos nucleicos, los aminoácidos y las proteínas. La urea es el principal componente NPN en el plasma (45%) y también se incluyen creatinina, ácido úrico, amoníaco y aminoácidos. Dado que la mayoría de estos componentes son excretados por los riñones, sus determinaciones individuales en suero, plasma u orina son utilizadas como indicadores de la función renal. El aumento de las concentraciones en suero de creatinina, urea y ácido úrico, se asocian a una función renal insuficiente. Sin embargo, se ha observado que en procesos como la gota (acumulación de sales de urato en articulaciones, riñones y tejidos blandos), enfermedad hepática, hemorragia gastrointestinal, entre otras, se pueden modificar los niveles séricos de algunos de los analitos antes mencionados.

• **UREA**



La urea constituye la fracción de nitrógeno no proteico más importante en la mayoría de los líquidos biológicos. Es la forma no tóxica del amoníaco que se genera en el organismo (hígado) a partir de la degradación de proteínas, que provienen tanto de la dieta como del recambio fisiológico, y se elimina por riñón. Debido a su pequeño tamaño, presenta una reabsorción y secreción variable en el túbulo renal acompañando al agua. Por lo tanto, la urea no representa un índice de filtrado glomerular (FG), en comparación con otras sustancias.

Los valores de referencia de urea en suero (**Uremia**) oscilan entre 15 y 45 mg/dL. Una elevación de su concentración, puede indicar disminución del 50% o más de la masa renal funcionante, exceso de aporte proteico exógeno y/o escaso aporte hídrico, pérdida de volemia (deshidratación, hemorragia), uso de fármacos (esteroides y tetraciclinas) y alteración de la función hepática. En consecuencia, la determinación de urea en plasma *per se*, no es característica de fallo renal, y siempre sus niveles séricos deben asociarse con los de creatinina endógena. Cuando los niveles circulantes de ambos analitos se encuentran aumentados es probable que sean indicativos de un compromiso renal.

A nivel renal, el aumento de urea en sangre (azoemia) puede ser debido a **causas prerrenales**: cuando se altera la circulación por el riñón, descompensación cardíaca, deshidratación a causa de ingestión reducida o pérdida excesiva de agua, aumento del catabolismo de proteínas, hemorragia, enfermedad de Addison; **causas renales** como por ejemplo glomerulonefritis crónica, nefritis crónica, riñón poliquístico, nefroesclerosis y necrosis tubular; y por **causas post-renales** que son cualquier tipo de obstrucción del tracto urinario como cálculos, tumores, etc.

La determinación de urea puede considerarse como una medida del nitrógeno ureico en sangre (**BUN**), ya que la mayoría del nitrógeno no proteico está en la urea. Al convertir el nitrógeno ureico (mg/dL) a urea en mmol/L (como se hace para calcular la osmolalidad del plasma), el resultado del BUN debe dividirse por 2,8. En situaciones de coma profundo, el BUN excede los 100 mg/dL.

Para mejorar la interpretación clínica se recomienda que tanto la urea como la creatinina séricas sean analizadas por el cociente BUN/Creatinina, siendo el intervalo de referencia para un adulto normal de 10 a 20.

- **CREATININA**

La creatinina ( $C_4H_7N_3O$ ) es el producto final del catabolismo de creatina (ácido  $\alpha$ -metilguanidín acético). La medición de creatinina es un índice muy útil para evaluar la función renal.

#### Síntesis y eliminación de creatina, fosfocreatina y formación de creatinina

La **creatina** se sintetiza en un proceso que incluye la síntesis inicial de ácido guanidínico acético, que tiene lugar en los riñones, mucosa del intestino delgado, páncreas y probablemente en hígado (Figura 1).

En riñón, L-arginina y glicina por medio de una transferasa forman el ácido guanidínico acético, que es transportado al hígado donde se metila dando origen a la creatina. Ésta en circulación llega a otros órganos tales como el cerebro y principalmente en músculo, donde se fosforila y se almacena como fosfocreatina (compuesto de alta energía). A partir de fosfocreatina, por medio de un proceso enzimático se obtiene creatinina liberándose fósforo, y por una reacción no enzimática, la creatina pierde agua y se transforma en **creatinina**, reacción mucho más lenta y en menor cantidad. Una proporción de la creatina libre en músculo (1-2 %/día) se transforma espontánea e irreversiblemente en creatinina y se libera a circulación a una velocidad relativamente constante. Los niveles séricos de creatinina (**Creatininemia**) sufren escasas variaciones, aunque los mismos están relacionados con la masa muscular, la actividad muscular y la ingesta de carne. Debido a que esta sustancia filtra libremente por el glomérulo y, en condiciones normales, no se reabsorbe aunque su secreción tubular es mínima, se emplea para evaluar la función de filtración a través del **clearance de creatinina**.

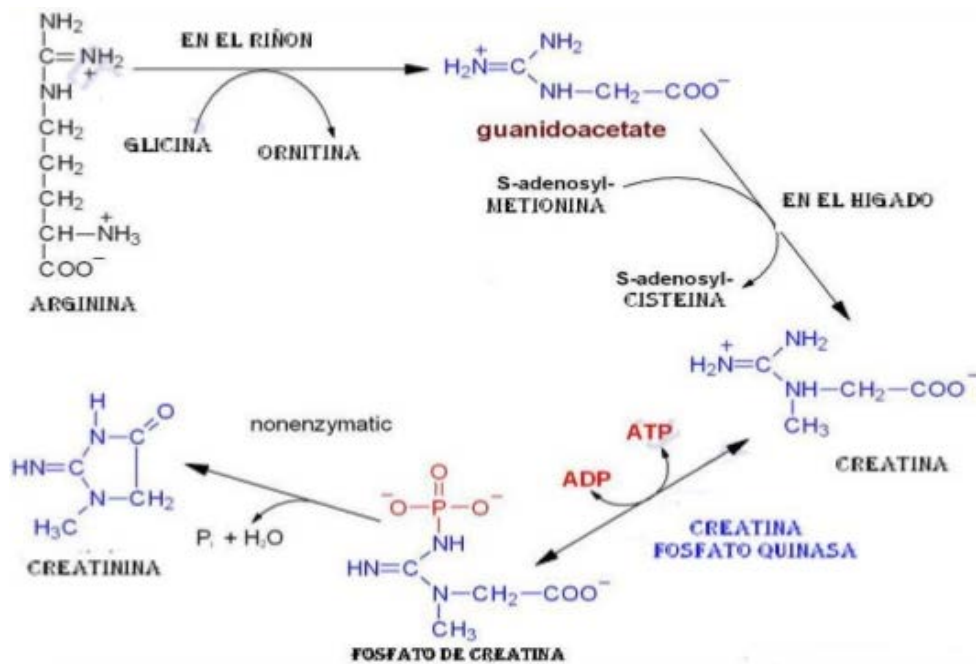


Figura 1. Síntesis de la creatina, fosfocreatina y formación de creatinina (<http://creatininametabolismo.blogspot.com.ar>)

## EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN DE FILTRACIÓN GLOMERULAR A TRAVÉS DEL CLEARENCE DE CREATININA

### Definición de “*Clearence*”

El *clearence* o depuración o aclaramiento de una sustancia, se define como el volumen de plasma que al pasar por los riñones queda completamente **libre de esa sustancia** en la unidad de tiempo (1 min).

$$\text{Clearence: } \frac{O \times V}{P} \text{ (expresado en mL/min)}$$

**O:** Concentración en orina de la sustancia en mg/mL.

**V:** Volumen urinario (minuto).

**P:** Concentración en plasma de la sustancia en mg/mL.

Cada sustancia tiene un *clearence* propio. Si bien algunas de ellas son simplemente ultrafiltradas por el riñón, otras son total o parcialmente excretadas por los túbulos.

La sustancia ideal para medir el Filtrado Glomerular (FG) debe reunir estos requisitos:

- Circular libremente por el plasma.
- No ser metabolizada en los tejidos.
- Filtrar libremente por el glomérulo.
- No ser reabsorbida, excretada ni metabolizada por los túbulos.
- Si son exógenas, no deben ser tóxicas.
- Ser determinada por metodología simple y segura.

Existen diversas sustancias exógenas y endógenas, que son utilizadas para conocer el filtrado glomerular. Entre las exógenas (se administran por vía intravenosa) se encuentra la Inulina, considerada como el “*gold standard*”, así como distintas moléculas marcadas con isótopos radiactivos (99mTc-DTPA, 51Cr-EDTA) y otras no isotópicas como manitol u iodoacetato. Todas ellas de difícil implementación en la práctica habitual debido a su laboriosidad, costo elevado y necesidad de metodología no disponible en un laboratorio clínico de rutina. Entre las sustancias endógenas, la concentración sérica de creatinina es la prueba más utilizada. Se han estudiado distintas proteínas de bajo peso molecular, como cistatina C y beta 2-microglobulina, aunque con resultados no concluyentes.

Ventajas de Creatinina sobre la inulina y el manitol:

- No requiere la administración de sustancias endovenosas.
- El nivel de la creatinina es constante en todo el tiempo de la prueba.
- Se puede realizar con la recolección de orina de 12 y 24 h.

## CLEARENCE ESTIMADO DE CREATININA

Como no se puede garantizar que la recolección de la orina sea adecuada (completa y correcta), se han propuesto distintas fórmulas que estiman el FG, sin requerir que la orina sea de 24 h. Las guías de práctica clínica en nefrología recomiendan la estimación del FG mediante ecuaciones de predicción que utilizan creatinina sérica y alguna de las siguientes variables: edad, género, raza y peso.

Las fórmulas más utilizadas en adultos son: Cockcroft-Gault y MDRD-4 (*Modification of Diet in Renal Disease*), CKD-EPI (*Chronic Kidney Disease-Epidemiology Collaboration*) y la ecuación de Schwartz en la población pediátrica.

- **Ecuación de COCKCROFT-GAULT:** permite calcular de manera aproximada la depuración de creatinina a partir de la creatinina en plasma. Incluye un factor de corrección para contrarrestar el efecto de la secreción tubular de creatinina en orina y hacerla más equivalente al FG.

<p><b>Clearance de Creatinina estimado</b> (mL/min/1,73m<sup>2</sup>): <math>\frac{(140 - \text{edad}) \times \text{peso corporal (kg)}}{P_{cr} \text{ (en mg/dL)} \times 72}</math></p>
--

P<sub>cr</sub>: creatinina en plasma. Valor de 72 se usa para varones. En mujeres multiplicar todo por 0,85

- **Ecuación Modificada de MDRD-4:** (Ecuación a utilizar para métodos de creatinina sin trazabilidad a IDMS)

<p><b>FG estimado</b> (mL/min/1,73 m<sup>2</sup>) = <math>186 \times (\text{creatinina})^{-1,154} \times (\text{edad})^{-0,203} \times (0,742 \text{ si mujer}) \times (1,21 \text{ si raza negra})</math> (Cr: mg/dL)</p>
--

- **Ecuación Modificada de MDRD-IDMS:** (Ecuación a utilizar para métodos de creatinina con trazabilidad a Espectrometría de Masa por Dilución Isotópica (IDMS))

<p><b>FG estimado</b> (mL/min/1,73 m<sup>2</sup>) = <math>175 \times (\text{creatinina}/88,4)^{-1,154} \times (\text{edad})^{-0,203} \times (0,742 \text{ si mujer}) \times (1,21 \text{ si raza negra})</math> (Cr: μmol/L)</p>
--

- **Ecuación Schwartz:** (Ecuación a utilizar para métodos de creatinina sin trazabilidad al método de referencia IDMS)

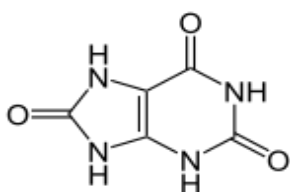
<p><b>FG estimado</b> (mL/min/1,73 m<sup>2</sup>) = <math>K \times (\text{talla} / \text{creatinina})</math> (Cr: mg/dL; talla en centímetros)</p> <p>K= 0,45 recién nacidos a término hasta 1 año          K= 0,33 bajo peso al nacer hasta 1 año          K= 0,55 niños/-as (2-12 años) y niñas adolescentes          K= 0,70 niños adolescentes</p>
--

La fórmula **MDRD-4** incluye sólo el valor de creatinina sérica, la edad, el sexo y la raza. En la actualidad, es la recomendada debido a su facilidad de implementación en los informes de laboratorio y sensibilidad en la detección precoz de la enfermedad renal crónica. La ecuación MDRD normaliza el FG a una superficie corporal de 1,73 m<sup>2</sup>, por lo que no se necesita el peso y es sencilla de automatizar para que la calcule el Sistema Informático de Laboratorio (SIL). Las limitaciones del uso de esta ecuación son la imprecisión y la infraestimación sistemática cuando los valores de la FG estimado son >60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>.

La ecuación CKD-EPI, usa también métodos de creatinina estandarizados y proporciona ventajas respecto al MDRD-IDMS, dado que presenta una mayor exactitud y mejora la capacidad predictiva del FG (especialmente entre valores de 60 y 90 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>).

En general, el uso de las ecuaciones para la estimación del FG (MDRD y CKD-EPI) es inadecuado en una serie de situaciones clínicas, especialmente en personas con peso corporal extremo (IMC <19 kg/m<sup>2</sup> o >35 kg/m<sup>2</sup>), dietas especiales o malnutrición, alteraciones de la masa muscular, amputaciones, <18 años, hepatópatas, embarazadas, fracaso renal agudo y en el estudio de potenciales donantes de riñón. En estos casos, para una adecuada medida de la función renal se requerirá la recogida de orina de 24 h para el cálculo del aclaramiento de creatinina.

### • ÁCIDO ÚRICO



El ácido úrico en sangre (**uricemia**) es el principal producto final del catabolismo de las purinas (ácidos nucleicos). Después de la absorción proteica por el intestino y de su metabolización hepática, los uratos se difunden con rapidez en todo el organismo.

La eliminación de ácido úrico como urato de sodio se hace por filtrado glomerular y reabsorción casi completa por el túbulo contorneado proximal del riñón para volver nuevamente al torrente urinario difundiendo al túbulo contorneado distal y de allí a formar parte de la excreción urinaria. El 80% de los uratos excretados son eliminados por la orina y la cantidad restante lo hace con la materia fecal.

El aumento del nivel el ácido úrico en sangre se presenta en los siguientes casos: gota, leucemias, anemias perniciosas, anemias hemolíticas, policitemias y enfermedad renal.

Se denomina **uricosuria** a la eliminación de ácido úrico por la orina. La uricosuria de 24 h y su relación con la uricemia servirá para establecer un diagnóstico fisiopatológico. Si la uricosuria supera los 700 mg/dL existe una sobreproducción de ácido úrico.

Las orinas hiperuricosúricas aparecen en el período postprandial después de una abundante ingesta de carne o entrañas y en los tratamientos de la gota con allopurinol. Así mismo se produce en las crisis gotosas y en personas con litiasis renal.

## PROTEÍNAS EN ORINA

Las proteínas plasmáticas de bajo peso molecular se filtran normalmente en forma libre a través del glomérulo renal y luego son reabsorbidas por los túbulos renales. Este proceso está en relación al peso molecular, carga y concentración plasmática de cada proteína. En individuos con una función renal conservada, los niveles de proteínas en orina son bajos (inferiores a 150 mg/24h). En particular, la reabsorción tubular es saturable y cualquier incremento en la filtración o disminución en la capacidad de absorción debido a daño tubular puede resultar en un incremento en la excreción de proteínas, lo que recibe el nombre de **proteinuria no fisiológica**.

En condiciones fisiológicas se puede observar un aumento en la excreción urinaria de proteínas: ejercicio intenso, fiebre, hipotermia, embarazo.

En condiciones patológicas, la cuantificación de proteínas en orina es un buen marcador para evaluar la función renal. El perfil de excreción de proteínas urinarias (evaluación cualitativa mediante electroforesis), al igual que la cuantificación individual de proteínas marcadoras de lesión tubular (por ejemplo: alfa 1-microglobulina, proteína de unión a retinol, etc.) son útiles para clasificar el tipo de proteinuria y establecer el nivel y grado de compromiso renal.

Cuando existe una disfunción glomerular se observa un aumento del pasaje de proteínas plasmáticas a través de los capilares del glomérulo. En cambio cuando la alteración ocurre a nivel tubular se produce una disminución en la capacidad de reabsorción de proteínas por los túbulos. La proteinuria aparece en enfermedades renales como el síndrome nefrótico, glomerulonefritis, hipergammaglobulinemia monoclonal, insuficiencia renal, nefropatía diabética, tumores renales malignos, entre otras.

La **nefropatía diabética** constituye una patología con elevada morbimortalidad y es la principal causa de ingreso a tratamiento de diálisis. El control estricto de la glucemia en etapa temprana en ausencia de albuminuria y también en presencia de ella, es la principal medida de prevención y tratamiento de esta patología.

En la *Diabetes Mellitus* (DM), la eliminación de glucosa por orina (**glucosuria**) es debido a la utilización inadecuada de carbohidratos por estos pacientes y va acompañada



de sed y poliuria. Generalmente se presenta cuando los niveles de glucosa en sangre (glucemia) son mayores a 180-200 mg/dL, ya que se supera la capacidad de reabsorción de los túbulos renales. La glucosuria puede aparecer aún cuando la glucemia se encuentre dentro de los valores de referencia.

La **Albuminuria**, se define como la excreción de 30 a 300 mg de albúmina en 24 h. Se detecta en forma temprana en los pacientes diabéticos y se puede usar como un marcador pronóstico de la nefropatía diabética en pacientes con DM. La presencia de albuminuria tiene un poder predictivo positivo para nefropatía del 80%.

Al momento del diagnóstico y durante el seguimiento del paciente diabético (según criterio médico), también es importante determinar la tasa de FG para establecer el grado de la función renal, mediante el *clearance* de creatinina estimado con la fórmula de MDRD-4 así como la excreción de albúmina.

La relación **albuminuria/creatininuria** en muestra aislada de orina es un buen predictor de nefropatía y enfermedad cardiovascular.

## CALIDAD EN LA ETAPA PRE-ANALÍTICA

### VERIFICACIÓN DE LA CORRECTA RECOLECCIÓN DE ORINA DE 24 HORAS

En el laboratorio clínico, la revisión de los métodos disponibles para detectar un error pre-analítico en la recolección de orina de 24 h es fundamental para descartar resultados erróneos en la depuración de creatinina (Cr). Para ello, una forma adecuada consiste en calcular la excreción de Cr por kg de peso corporal y por día. Sin embargo, en la práctica clínica el paciente no siempre cumple estrictamente con las indicaciones previas brindada por el profesional. Para determinar si la recolección de orina de 24 h es la correcta, se calcula la excreción teórica de creatinina por día ( $Ex_t$  Cr/día), mediante el **índice de Walser** (para adultos) y el **criterio de Ghazali** (para niños). No obstante, las ecuaciones que estiman el FG renal a partir de distintos parámetros (creatinina, edad, sexo, etnia, masa corporal, entre otros) constituyen un elemento más de control.

### MÉTODOS PARA CORROBORAR LA RECOLECCIÓN DE ORINA DE 24 h:

#### 1- Excreción de creatinina por kg de peso corporal y por día

Teniendo en cuenta que cada persona excreta en un período de 24 h una cantidad constante de Cr, una forma para detectar si la recolección de orina de 24 h consiste en comparar la excreción medida de Cr, por kg de peso corporal y por día, respecto de los

intervalos de referencia. La excreción de Cr en orina se mantiene dentro de un rango determinado y estable de no mediar variaciones extremas de masa muscular corporal y la dieta (Cuadro 2). En adultos mayores estos valores descienden hasta un 50% por disminución de la masa muscular, por lo que la excreción diaria de Cr en adultos con edades comprendidas entre 50 y 70 años se encuentra en un rango de 15,7-20,2 mg/kg/día en los hombres y 11,8-16,1 mg/kg/día en mujeres.

Cuadro 2: Valores de creatininuria en población adulta por sexo, en niños y lactantes

	<b>Creatininuria (Intervalo de Referencia)</b>
<b>Hombres</b>	20-25 mg/kg/día
<b>Mujeres</b>	15-20 mg/kg/día
<b>Niños</b>	15-25 mg/kg/día
<b>Lactantes</b>	12-14 mg/kg/día

**Ejemplo práctico:** Paciente masculino de 68 años; 75 kg de peso; Cr Plasmática: 6,80 mg/dL; Volumen urinario: 3900 mL; Cr Orina: 74 mg/dL ó 2886 mg/día; Clearance Cr informado: 30 mL/min

**Cálculo de la creatinina urinaria** (para determinar si la orina estuvo bien recolectada)

CrU: 74 mg----- 1 dL (100 mL)  
 100 mL-----74 mg  
 3900 mL----- x= 2886 mg/día

75 kg----- 2886 mg/día  
 1 kg ----- x: .....

**Completar:**

**Cr urinaria diaria medida realmente:** .....

**Cr urinaria diaria esperada (IR):** .....

**Conclusión:**.....

**2- Índice de Walser (IW)**

Este índice relaciona la creatinina medida en orina (CrUM) y la creatinina estimada en orina (CrUE).

<b>IW= CrUM/CrUE</b>
----------------------

VALOR DE REFERENCIA

IW: 0,9 a 1,10	→	Buena Recolección de orina
IW: menor de 0,75 o mayor de 1,25	→	Recolección Incorrecta de la muestra
IW: 0,75 a 0,9 o de 1,1 a 1,25	→	Calcular la depuración aplicando el factor de corrección: Depuración de Cr/IW

NOTA: Para calcular la CrUE se debe aplicar la siguiente fórmula, dependiendo del sexo.

<b>CrUE Hombres (mg/día)</b>	<b>(28,2-0,17 x edad) x peso</b>
<b>CrUE Mujeres (mg/día)</b>	<b>(21,9-0,115 x edad) x peso</b>

**3- Criterio de Ghazali (1974)**

Se aplica en niños y adolescentes.

- La Cr que debe eliminar el niño por orina se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{CrU por día estimada} = 15 + 0,5 \times \text{edad en años} \pm 6 \text{ (2 DS).}$$

- Lo que realmente eliminó el paciente se calcula aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{CrU por día medida} = \text{CrU} \times \text{V} / 8,84 \times \text{P}$$

Referencias: Cr medida en  $\mu\text{mol/L}$ ; V= volumen urinario de 24 h en L; P= peso en kg.

- El resultado se expresa como: CrU por día medida = excreción de Cr en mg/kg/día
- El resultado pondrá en evidencia si la recolección de la muestra fue correcta o incorrecta, por exceso o por defecto, según el valor obtenido sea mayor o menor al estimado.

**Ejercicio**

Calcular el IW a partir de los siguientes datos: paciente de sexo masculino, 68 años, 75 kg de peso, Cr Plasmática 6,80 mg/dL; Cr Orina 74 mg/dL; Volumen urinario 3900 mL. Clearance Cr informado: 30 mL/min.

## ACTIVIDAD PRÁCTICA

- Determinar la concentración de urea en suero.
- Determinar los niveles de creatinina en suero y orina. Clearance de Creatinina.
- Aprender una técnica de cuantificación de proteínas en orina.
- Análisis de orina completa para evaluar los Índices que correspondan con cribado en tira reactiva.
- Interpretar los resultados obtenidos – Realizar un informe.

### DETERMINACIÓN DE UREA

(Método enzimático de Berthelot modificado)

#### FUNDAMENTO

Por acción de la enzima ureasa se produce hidrólisis de la urea produciendo  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_3$ , éste reacciona con el fenol e hipoclorito en medio alcalino, produciendo azul de indofenol, que se determina colorimétricamente. El color azul desarrollado es proporcional a la cantidad de urea presente.

Para la determinación de urea en orina se sigue la misma técnica que en sangre. La orina se diluye con agua destilada o solución fisiológica, ya que el contenido de urea se relaciona con la densidad.

Hasta 1.015..... diluir 1/10

De 1.016 a 1.025..... diluir 1/20

Mayor a 1.025..... diluir 1/40

Como la orina contiene cantidades variables de amoníaco debe efectuarse un blanco de orina (BD). Para la preparación de BD se procede igual que para el blanco de reactivo (B), con la diferencia que, luego de agregar el reactivo 1 y antes del 2, se adicionan 20  $\mu\text{L}$  de la dilución de orina. Posteriormente, se lleva el aparato a cero con B y se lee el estándar (S), el BD y el Desconocido (D).

TÉCNICA

	BLANCO	TESTIGO	DESCONOCIDO
Sol. buffer de ureasa	1 gota	1 gota	1 gota
Sol. testigo de urea	---	20 µL	---
Plasma, suero u orina (dilución)	---	----	20 µL

Mezclar por agitación suave. Incubar 5 minutos a 37 °C.

Reactivo 1 (fenol)	1mL	1mL	1mL
Reactivo 2 (hipoclorito alcalino)	1mL	1mL	1mL

Mezclar por agitación suave e incubar 5 minutos a 37 °C

Agua destilada	10 mL	10 mL	10 mL
----------------	-------	-------	-------

Mezclar por inversión. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente. Leer a 540 en espectrofotómetro llevando a cero con el blanco. El color de la reacción final es estable 12 h.

CÁLCULOS Y RESULTADOS

$$\text{Urea en plasma o suero g/L} = D \times f \qquad f = \frac{0,6 \text{ g/L}}{S}$$

$$\text{Urea en orina g/L} = \frac{(D-BD) \times 0,6 \text{ g/L}}{S} \times \text{dilución}$$

0,6 g/L = concentración del estándar (S)

S = Lectura de densidad óptica de S

D: Desconocido

B: Blanco de reactivo

BD: Blanco de orina

f: factor

VALORES DE REFERENCIA: 0,15-0,45 g/L

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia. Normalmente, la eliminación de urea está sujeta a variaciones dependientes de la dieta. Considerando el término medio y una dieta mixta corriente, se excreta alrededor de 30 g/24 h, con oscilaciones comprendidas entre 20 y 40 g.

## DETERMINACIÓN DE CREATININA EN SUERO Y ORINA

La valoración de creatinina puede realizarse por diferentes métodos:

- a) Reacción de Jaffé (técnica de Owen, técnica cinética o el método de referencia que elimina interferentes mediante el uso de caolín o reactivo de Lloyd).
- b) Por métodos enzimáticos (creatinina hidrolasa, creatinina deaminasa).
- c) Por cromatografía de alta performance (HPLC).

En el trabajo práctico se empleará la **Reacción de Jaffé** (Jaffé, 1886; Owen y col., 1954), por simplicidad y buena correlación con la clínica.

### Reacción de Jaffé (Método colorimétrico)

#### FUNDAMENTO

La creatinina reacciona con picrato en solución alcalina dando lugar a la formación de un pigmento de color naranja brillante (reacción de Jaffé). Dicho pigmento, llamado complejo de Janowsky, es una sal de creatinina, ácido pícrico e NaOH que se forma proporcionalmente a la cantidad de creatinina presente. El mismo presenta máxima absorbancia a 485 nm. No obstante, las lecturas se realizan a **510 nm** debido a que a 485 nm también absorbe picrato alcalino.

#### Factores de importancia a considerar en la determinación de creatinina

**Ácido Pícrico:** debe emplearse puro, debido a que la presencia de impurezas aumentan los blancos y dan falsos resultados en las muestras problemas. Es importante la concentración de ácido pícrico, aunque se ha demostrado que si la variación no es muy grande no produce errores. De allí el inconveniente de las técnicas que emplean solución saturada de ácido pícrico, pues la solubilidad del mismo varía ampliamente con la temperatura (cuando el reactivo es conservado en la heladera).

El ácido pícrico cumple la doble función, una desproteínizar y la otra cambiar el medio a un pH alcalino. De esta manera se produce una reacción medible por métodos colorimétricos.

**Temperatura:** si se mantiene entre 15-25 °C, su efecto sobre el desarrollo del color es nulo. Las variaciones de temperatura influyen más sobre el picrato alcalino que sobre el picrato de creatinina alcalino. Esa influencia se ejerce de manera proporcional en el testigo y en la muestra problema no así sobre el blanco.

**Precipitación de proteínas:** son los interferentes positivos más importantes de la reacción de Jaffé. Los grupos  $\alpha$ -cetometilo y  $\alpha$ -cetometileno reaccionan con el picrato alcalino formando complejos coloreados.

**pH:** la intensidad de color del picrato alcalino disminuye al descender el pH; el del picrato de creatinina alcalino aumenta, de manera que el blanco y el problema varían de forma diferente. Como el testigo y el problema se modifican en el mismo sentido, el error disminuye. El uso de NaOH a una concentración exacta contribuye a estandarizar la técnica.

## OBTENCIÓN DE MUESTRAS

### Suero – Orina

- **Extracción de sangre:** se realiza de la manera habitual.

Se prefiere *suero o plasma* frente a sangre total. En el caso del plasma, anticoagulantes como el Na<sub>2</sub>EDTA y heparina de sodio son satisfactorios. El suero o plasma (separado rápidamente de los glóbulos rojos) es estable por 24 h a 4 °C, y mayor tiempo si se congelan.

- **Recolección de Orina de 24 h:** se indica al paciente que vacíe su vejiga a una determinada hora (por ej. 7:30 am), deseche esa orina y junte todas las demás incluyendo la orina emitida a la misma hora del día siguiente, cuidando de no perder material. Mantener en refrigerador (2 a 10 °C). Medir la diuresis y hacer una dilución 1/50. En caso de que la diuresis sea de 2 h, multiplicar el volumen medido por 12.

## MATERIALES

- Espectrofotómetro o fotocolorímetro
- Micropipetas y pipetas
- Baño de agua a 37°C (opcional)
- Tubos de kahn o de hemólisis
- Gradillas, Reloj o timer

## REACTIVOS

- Reactivo 1:** Ácido pícrico 41.4mmol/L
- Reactivo 2:** Buffer glicina/ NaOH 1 mol/L, pH=12.4
- Estándar (S):** Solución de creatinina 20 mg/L
- Agua destilada

## PROCEDIMIENTO

En caso que la muestra a utilizar sea SUERO, se debe efectuar una desproteínización de la siguiente manera: a 0,7 mL de suero, agregar 3,5 mL de Reactivo 1. Mezclar por inversión. Dejar reposar 10 minutos y centrifugar a 3.000 rpm por 5 minutos.

- En tres tubos de fotocolorímetro identificados como B (blanco), S (Estándar) y D (desconocido) colocar:

	<b>B</b>	<b>S</b>	<b>D (Suero)</b>	<b>D (Orina)</b>
<b>Desproteínizado</b>	---	---	3 mL	---
<b>Estándar</b>	---	0,5 mL	---	---
<b>Orina dil:1/50</b>	---	---	---	0,5 mL
<b>Agua destilada</b>	1 mL	0,5 mL	---	0,5 mL
<b>Reactivo 1</b>	2 mL	2 mL	---	2 mL
<b>Reactivo 2</b>	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL

Mezclar por inversión. Incubar 20 minutos a temperatura ambiente. Luego leer en espectrofotómetro a 510 nm y llevar a cero el aparato con agua estilada.

### CÁLCULOS

Corregir las lecturas de S y D (restar el blanco, tubo B)

1) **Creatinina en suero** (mg/L) =  $D \times f$

$$f = \frac{20 \text{ mg/L}}{S}$$

2) **Creatinina en orina** (g/24h) =  $\frac{D}{S} \times V$

V: volumen de diuresis expresados en L /24 h

La fórmula surge de: Creatinina en orina g/24h =  $\frac{D}{S} \times 0,020 \text{ g/L} \times 50 \times V$

0,02 g/L: concentración del Estándar (S).

50: factor de dilución.

### VALORES DE REFERENCIA

Creatinina en sangre: 8 -14 mg/L

Creatinina en orina: 0,9 - 1,5 g/24 h

### CORRELACIÓN CLÍNICO-PATOLÓGICA

La **Creatinina** se encuentra aumentada en:

- Nefritis con retención nitrogenada.
- Obstrucción renal por causa mecánica (obstrucción prostática, cálculos con anuria).
- Enfermedades musculares severas.
- Hipertiroidismo



## CLEARENCE DE CREATININA

### PREPARACIÓN DEL PACIENTE

- Dieta hipoproteica: durante 48 h previas a la prueba, el paciente debe ingerir no más de 100 g de carne diarios. Esta indicación se hace con la finalidad de disminuir la excreción de creatinina por los túbulos renales y evitar una sobreestimación del FG.
- Hidratación: el paciente debe ingerir agua en cantidad suficiente para alcanzar un volumen minuto de 2 mL/min o superior. En caso de realizar la prueba en tiempos cortos el paciente debe ingerir 500 mL de agua antes de iniciar la prueba y luego un vaso cada 45 minutos.
- Suprimir: bebidas (té, café, mate, cerveza) o fármacos que puedan modificar la FG.
- No realizar ejercicios musculares intensos el día que realizará la prueba.
- Solicitar al paciente datos de peso, altura y edad.

### OBTENCIÓN DE MUESTRAS

- **Orina**: de 24 h. También se puede utilizar orina de 4, 8 ó 12 h. La recolección debe realizarse en dos períodos de tiempos iguales, registrándose los tiempos exactos en que se inicia y se finaliza la recolección.
  - Se procederá de la misma forma para cualquier período de tiempo. Debe resaltarse que no es tan importante cumplir el tiempo establecido para la recolección como **conocer exactamente el tiempo real** de recolección así como el **volumen total** de orina eliminado.
  - El clearance de creatinina también puede realizarse en períodos de tiempo más cortos (menor a 4 h). En este caso será necesario el uso de una sonda para la extracción de orina, de lo contrario se produce un error importante debido a que el volumen de orina retenido en vejiga es considerable con relación al volumen recolectado. Debe destacarse que en este procedimiento aumenta el riesgo de provocar infecciones urinarias (daño al estado del paciente por una acción médica).
- **Extracción de sangre**: obtención de suero

### CONSERVACIÓN DE MUESTRAS

- Orina: debe evitarse la proliferación bacteriana y variaciones importantes de pH, ya que en medio alcalino la creatinina se transforma en creatina. Las muestras pueden conservarse 7 días a 4 °C y por mayor tiempo si se congelan.
- Suero o plasma: es estable 24 h a 4°C y por mayor tiempo a -20 °C.

### PROCEDIMIENTO

a) Se determina la concentración de creatinina en sangre y orina (ver técnica y cálculos en pág. 114).

b) CÁLCULOS: **Clearence de Creatinina endógena (C.C.E.)**

$$\text{C.C.E: mL/min} = \frac{\text{Creatinina en orina g/24 h}}{\text{Creatinina es suero mg/L}} \times 694 \text{ mL/min. } \quad (1)^*$$

Donde:

$$694 \text{ mL/min: } \frac{\text{g/24h}}{\text{mg/L}} = \frac{1000\text{mg} \times 1000 \text{ mL}}{1\text{mg} \times 1440 \text{ min}} = \frac{1.000.000 \text{ mL}}{1440\text{min}}$$

#### VALORES DE REFERENCIA

**C.C.E:** 80 a 140 mL/min (promedio 125 mL/min)

Estos valores de C.C.E corresponden a adultos hasta 60 años. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

- Como el filtrado glomerular determinado con creatinina varía con la superficie corporal, si el paciente se aleja del normotipo (superficie corporal 1,73 m<sup>2</sup>), es decir obeso, delgado, alto, niños, entre otros, se aplica el factor de corrección (1,73 m<sup>2</sup>/ A m<sup>2</sup>: SCC).

Referencia: **A** (superficie corporal del paciente), se determina a partir de nomogramas o fórmulas que relacionan la superficie con el peso y la altura. **SCC:** superficie corporal corregida.

Clearence de Creatinina Endógena Corregida (C.C.Ec)

$$\text{C.C.Ec: } (1)^* \times \frac{1,73}{A}$$

VALOR DE REFERENCIA DEL FG POR CLEARENCE DE CREATININA:

Hombres: 105 ± 20 mL/minuto (SCC)  
Mujeres: 95 ± 20 mL/minuto (SCC)

#### VARIABLES A CONSIDERAR

- El *clearence* de creatinina resuelve el problema de la variabilidad de masa muscular, pero introduce la variable de la recolección de orina y la secreción tubular de creatinina, lo cual puede sobreestimar o subestimar el FG.
- La causa más frecuente de error es la mala recolección de la muestra de orina, tanto por pérdida de material como por tomar mal el tiempo de recolección.

- Una mala hidratación del paciente, que no se asegure un flujo de orina mínimo de 2mL/min.
- A medida que el fallo renal progresa se filtra menos creatinina y proporcionalmente una mayor cantidad de la creatinina urinaria deriva de la secreción tubular. En sujetos normales el 5-10% de la creatinina urinaria deriva de la secreción tubular, mientras que este porcentaje es mayor en pacientes con insuficiencia renal crónica.
- Existe una marcada variabilidad en la magnitud de la secreción de creatinina en cada paciente y en el mismo paciente a través de la progresión de la insuficiencia renal. El *clearance* de creatinina puede sobreestimar el FG en el fallo renal avanzado tanto como 70%.
- Drogas como la cimetidina, trimetoprima, y otros aniones orgánicos pueden inhibir la secreción tubular de creatinina y reducir el *clearance* de creatinina sin afectar el FG.

## DETERMINACION CUANTITATIVA DE PROTEINAS TOTALES EN ORINA

### FUNDAMENTO

Es un método colorimétrico de fijación a un colorante. Los grupos amino básicos de las proteínas presente en la orina reaccionan en medio ácido (pH 2,5) con una solución de **Rojo de Pirogalol-Molibdato**, originando un complejo coloreado (azul-violáceo) que se cuantifica espectrofotométricamente a 600 nm.

**Proteína + sol. Rojo de pirogalol-molibdeno → Complejo proteína-Rojo de pirogalol-Molibdeno**

- Es un método sensible y fácilmente adaptable a analizadores automáticos.
- El procedimiento manual es lineal hasta 2 g/L (200 mg/dL). Límite de sensibilidad analítica: 1,0 mg/dL.

### REACTIVOS

- Rojo de Pirogalol: solución estabilizada de Rojo de Pirogalol 0,1 mmol/L, molibdato de sodio 0,1 mmol/L en buffer succinato 50 mmol/L, pH 2,5.
- Solución Estándar: solución de albúmina 100 mg/dL (1,0 g/L)

Estabilidad de los reactivos: estables en refrigerador (2-10 °C), hasta la fecha de caducidad.

- El reactivo Rojo de Pirogalol debe protegerse de la luz.

Deterioro de los Reactivos: Cuando el espectrofotómetro se ha llevado a cero con agua destilada y se observan lecturas de absorbancia a 600 nm del Rojo de Pirogalol superiores a 0,25 DO o inferiores a 0,03 DO, indican un deterioro del reactivo (DO: densidad óptica).

**MUESTRA: Orina**

- a) **Recolección de la muestra:** la muestra de elección es orina recogida en un período de 24 h. Ante la sospecha de una proteinuria ortostática se recomienda que la recolección se realice en recipientes separados: en uno se coloca la orina del período de actividad y en el otro, la muestra correspondiente al período de reposo. Medir la diuresis. En caso que las orinas sean turbias es conveniente centrifugarlas.
- b) **Estabilidad e instrucciones de almacenamiento:** La orina debe mantenerse a 4 °C durante y con posterioridad a la recolección. Puede emplearse azida sódica como conservante cuando se requiera en una concentración de 0,1 g/L. El material es estable 2-3 días a 4 °C y al menos 3 meses a -20 °C.

**PROCEDIMIENTO**

Llevar a temperatura ambiente los reactivos y las muestras antes de iniciar el ensayo. En tres tubos de fotocolorímetro o cubetas espectrofométricas marcadas B (Blanco), S (Estándar) y D (Desconocido), colocar:

	<b>B</b>	<b>S</b>	<b>D</b>
<b>Standard</b>	-----	20 µL	-----
<b>Muestra</b>	-----	-----	20 µL
<b>Rojo de Pirogalol</b>	1 mL	1 mL	1 mL

Mezclar e incubar los tubos durante 10 minutos a 37° C. Leer en espectrofotómetro a 600 nm, llevando a cero el aparato con el Blanco. El color es estable durante 30 min.

**CÁLCULOS**

1) **Proteínas en orina de 24 h:**  $\text{mg de proteínas} / 24 \text{ h} = \frac{D}{S} \times V \times 1000$

V= volumen de la diuresis expresado en L/ 24 h

2) **Proteínas en orina ocasional:**  $\text{mg/dL proteínas} = \frac{D}{S} \times 100$

**VALORES DE REFERENCIA**

Orina de 24 h: 30-140 mg/ 24 h (hasta 160 mg/ 24 h en embarazadas).

Orina Ocasional: 25 mg/dL

Estos valores se dan únicamente a título orientativo; es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia.

## DETERMINACIÓN DE ALBÚMINA EN ORINA

### 1) Método Inmunocromatográfico

#### FUNDAMENTO

Es un ensayo semicuantitativo basado en la unión competitiva entre la albúmina fija en el conjugado colorante y la albúmina libre presente en la orina. Cuando la albúmina está presente en la muestra, ésta compite con la albúmina conjugada con colorante por un número limitado de anticuerpos en la membrana de ensayo.

#### INDICACIONES

- a) Recolectar la muestra de orina en recipientes limpios, libre de detergentes.
- b) Para una óptima detección es preferible la primera orina de la mañana ya que este tipo de muestra es biológicamente menos variable que las muestras tomadas al azar.
- c) En caso de no realizar el ensayo inmediatamente la muestra debe guardarse en heladera (4-8 °C) hasta 24 h, en cuyo caso al momento de realizar el ensayo la muestra debe estar a temperatura ambiente. Si el ensayo demora más de 24 h, la muestra debe congelarse y llevar a temperatura ambiente previo a la realización del ensayo. Evitar congelar y descongelar repetidamente la muestra.

#### INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

**Positivo:** La intensidad de color de la línea de control es más fuerte que el color de la línea de test, indicando que la concentración de albúmina es superior a 20 µg/mL.

**Valor Límite:** La intensidad de color de la línea de control y la línea de test son equivalentes. La concentración de albúmina está entre 10 µg/mL y 20 µg/mL (10 mg/L y 20 mg/L).

**Negativo:** La intensidad del color de la línea de test es más fuerte que el color de la línea control. La concentración de albúmina es inferior a 10 µg/mL (10 mg/L).

#### LIMITACIONES DEL MÉTODO

- En caso de fiebre, infección aguda, embarazo o práctica deportiva intensa, la concentración de albúmina en las muestras de orina puede incrementarse. No realice el test bajo ninguna de estas condiciones.
- El consumo insuficiente (alrededor de 1 L por día) o excesivo de líquidos durante el día, antes de realizar el test, puede generar resultados falsos positivos y falsos negativos.
- Residuos de detergente que hubieran quedado (al realizar su limpieza) en el recipiente de recolección de muestra de orina puede interferir en la reacción normal de ensayo.

## 2) Método Inmunoturbidimétrico

### FUNDAMENTO

La albúmina reacciona con el anticuerpo específico formando inmunocomplejos insolubles. La turbidez causada por estos inmunocomplejos es proporcional a la concentración de albúmina en la muestra y puede ser medida espectrofotométricamente.

### RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA DE ORINA

a) Obtener la muestra de la manera usual. Pueden utilizarse tanto la primera orina de la mañana, como orinas de 3, 8, 12 ó 24 h de recolección. Las muestras no deberán ser recolectadas después de realizar ejercicio, en presencia de infecciones del tracto urinario, durante enfermedad aguda, después de una cirugía o sobrecarga líquida aguda.

b) Aditivos: no se requieren.

c) Sustancias interferentes: no se observan interferencias por creatinina hasta 440 mg/dL, urea hasta 4500 mg/dL, bilirrubina hasta 25 mg/dL (250 mg/L), ácido ascórbico hasta 500 mg/dL e IgG hasta 2300 mg/dL.

No deben emplearse muestras de orina que contengan hemoglobina y/o sangre.

Muestras que evidencian turbidez deberán ser centrifugadas y usar sólo el sobrenadante para realizar el ensayo.

### CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

1) Calcular la diferencia de absorbancia ( $\Delta A = DO_2 - DO_1$ ) correspondiente a cada muestra analizada. Interpolar esta  $\Delta A$  en la curva de calibración para determinar la concentración de albumina (mg/L). Las muestras con absorbancias superiores al último punto de calibración deben ser diluidas (1:2 ó 1:4) con solución fisiológica y procesadas nuevamente. Multiplicar el resultado obtenido por la dilución efectuada.

2) Albúmina en orina (mg/24 h) = Albúmina (mg/l) x V (volumen de la diuresis expresado en litros/24 h)

3) Para evitar la necesidad de cronometrar la recolección de orina se emplea la **relación Albuminuria/Creatinina**:

$\text{Albuminuria/Creatinina (mg/g)} = 1000 \times \text{Albuminuria (mg/L)} / \text{Creatinina (mg/L)}$
---

Siendo 1000 el factor de conversión de mg a g de Creatinina

## VALORES DE REFERENCIA

	Excreción urinaria de Albúmina		
	mg/24h	µg/min	mg/g de Creatinina
Normal	< 30	< 20	< 30
Albuminuria	30-300	20-200	30-300
Albuminuria clínica	> 300	> 200	> 300

En general se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia, dentro de su población de pacientes. Los resultados de albuminuria deberán ser evaluados en conjunto con la historia clínica del paciente, el examen médico y otros hallazgos de laboratorio.

## CONTROL DE CALIDAD

- Utilizar Calibrador (Tipo Turbitest AA) y Control 2 niveles (tipo Turbitest AA).
- Los Controles son procesados de la misma manera que las muestras.
- Verificar el método a través de ensayos de Reproducibilidad, Límite de detección, Rango de medición. Los datos de performance pueden variar cuando se emplea diferentes analizadores automáticos o técnica manual.

**DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE PROTEINURIA/CREATININURIA**

1) Realizar un análisis de orina completa utilizando la primera orina de la mañana. La muestra de orina puede conservarse 7 días en heladera y por más tiempo a -80 °C.

## 2) PROCEDIMIENTO

- Realizar cribado mediante tiras reactivas. Sumergir la tira completamente por no más de 1 segundo en muestra de orina fresca (en particular fijarse en la almohadilla de proteínas).
- Centrifugar un volumen de orina. Descartar el sobrenadante y observar el sedimento al microscopio óptico.
- Si el sedimento presenta infección urinaria o hematuria no se considera una muestra representativa para determinar los índices.
- Si en la tira la reacción de proteínas es trazas o positiva se realiza el **ÍNDICE PROTEINURIA/CREATININURIA (IPC)**.
- Si el resultado es negativo, y el laboratorio dispone de metodología inmunoturbidimétrica o nefelométrica se puede determinar el **ÍNDICE ALBÚMINURIA/CREATININURIA (IAC)**.
- El análisis de las proteínas y creatinina en orina se realizará mediante los procedimientos mencionados anteriormente.

- Tener en cuenta las unidades de medida: para proteínas son mg/dL. Con respecto a la orina, se debe diluir 1/50 para evaluar la creatinina, recordar que se debe incluir en los cálculos el factor de dilución y llegar a la expresión del resultado en mg/g. ¿Cómo realiza el cálculo?

**VALORES DE REFERENCIA**

**IAC:** <30 mg/g

**IPC:** <300 mg/g

**INFORME DE FUNCIONAL RENAL**

Creatininemia:..... mg/dL

Creatininuria:..... g/24 h

Clearence de Creatinina Endógena (C.C.E):..... mL/min

Diuresis:..... mL/24h

Superficie Corporal:.....m<sup>2</sup>

Clearence de Creatinina Endógena Corregido (C.C.Ec):.....mL/min/1,73m<sup>2</sup>

Proteinuria de 24 h:.....mg/24 h

**INFORME UTILIZANDO ÍNDICES VARIOS**

Creatininemia:..... mg/dL

MDRD-4: ..... mL/min/1,73m<sup>2</sup>

Índice A/C:..... mg/g

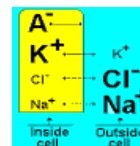
Índice P/C.....mg/g



## BIBLIOGRAFÍA

- ANÁLISIS DE ORINA Y DE LOS LÍQUIDOS CORPORALES. S King Strasinger y M Schaub Di Lorenzo. 6ª Edición. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires 2016.
- MEDICINA DE LABORATORIO. FUNDAMENTOS Y APLICACIONES EN EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO. I Antonozzi y E Gulletta. 1ª Edición. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires 2015.
- DOCUMENTO DE CONSENSO PARA LA DETECCIÓN Y MANEJO DE LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA. A Martínez-Catelao y col. Revista de Nefrología 2014; 34: 243-262.
- EL LABORATORIO EN EL DIAGNOSTICO CLINICO. JB HENRY. 20ª Edición. Ed. Marbán, España 2010.
- FISIOPATOLOGÍA. SALUD-ENFERMEDAD: UN ENFOQUE CONCEPTUAL. CM Porth. 7ª Edición. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires 2006.
- INTERPRETACIÓN CLÍNICA DEL LABORATORIO G Angel y M Angel. 7ª Edición. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires 2006.
- HARRISON PRINCIPIOS DE MEDICINA INTERNA. DL Longo, AS Fauci, DL Kasper, SL Hauser, JL Jameson, J Loscolzo J. 18ª Edición. Ed. Mc. Graw Hill, España 2012.

## TRABAJO PRÁCTICO N° 5



### HOMEOSTASIS Y ALTERACIONES DEL EQUILIBRIO HIDRO-ELECTROLÍTICO

#### OBJETIVOS

- Revisar los conceptos sobre los compartimientos líquidos del organismo. Agua corporal: ganancia y pérdida, regulación, solutos, desplazamiento entre compartimientos de líquidos.
- Interpretar e informar los resultados de un desequilibrio hidro-electrolítico en el contexto de una situación clínica.

#### INTRODUCCIÓN

La composición del medio interno precisa una relación con pequeño margen de variación entre agua y electrolitos para asegurar un buen funcionamiento metabólico del organismo (Figura 1).

En el adulto normal, el agua corporal representa aproximadamente el 60% de su peso. Esta proporción es menor en las mujeres (50%) respecto de los hombres. Además, va cambiando con la edad: es del 75% en los niños en su primer año de vida y disminuye alrededor del 45-50% en individuos mayores de 60 años. El contenido acuoso es máximo en el tejido cerebral (aproximadamente el 90%) y mínimo en el tejido adiposo.

La mayor parte del agua total del cuerpo se halla en el líquido intracelular (LIC, 40% del peso corporal) y el 20% restante en el líquido extracelular (LEC) y su distribución obedece a las fuerzas hidrostáticas y osmóticas que actúan a través de las membranas biológicas, determinando así la naturaleza de casi todos los procesos fisiológicos. En el LEC, el agua se reparte entre el líquido intersticial y linfático (15% del peso corporal), el plasma (3-4% del peso), y los líquidos transcelulares (1-2% del peso), que incluyen el líquido gastrointestinal, orina, líquido cefalorraquídeo, entre otros.

La pared capilar, que separa el plasma del LIC, es permeable al agua y electrolitos, pero restringe el flujo de las proteínas. Es decir, que mientras los iones y las moléculas de bajo peso molecular se hallan distribuidos de manera similar en el LEC y plasma, la concentración de proteínas es cuatro a cinco veces mayor en el plasma que en el LIC.

El desplazamiento del agua entre los espacios intracelular y extracelular está determinado por la diferencia de concentración de los solutos osmóticamente activos a cada lado de las membranas celulares. Si se altera la osmolaridad de un compartimento, el agua se desplazará a través de la membrana celular para restablecer el equilibrio osmótico.

RECORDAR:

La **Osmolaridad** es la cantidad de partículas osmóticamente activas (osmoles) disueltas en un volumen total de 1 litro de solvente (Osm/L).

La **Osmolalidad** es la cantidad de osmoles por kilogramo de solvente (Osm/Kg).

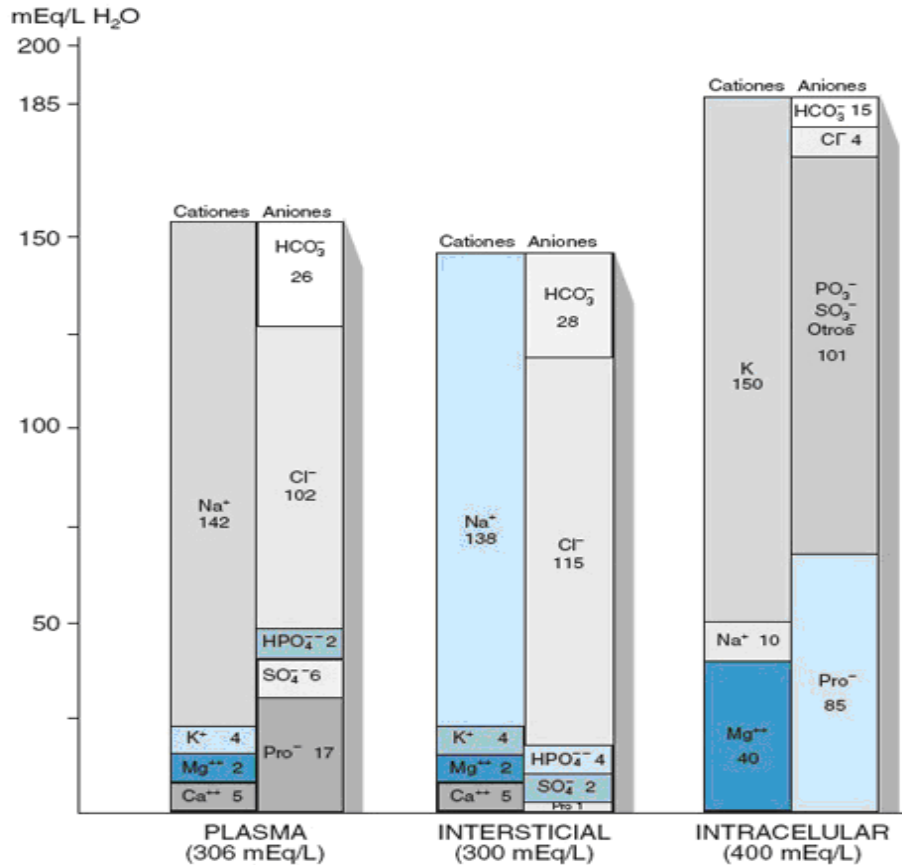


Figura 1. Distribución de los electrolitos en los diferentes compartimientos líquidos (<http://tratado.uninet.edu/>)

La Osmolalidad se relaciona directamente con la concentración molar de todos los solutos y con el número de partículas en las que se disocian en dicha solución. Los principales determinantes de la osmolalidad plasmática son el sodio con sus aniones acompañantes (Cl<sup>-</sup> y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), la glucosa y la urea.

La mayoría de los laboratorios clínicos utilizan los osmómetros de descenso crioscópico, es decir que se basan en una propiedad física de las soluciones como es la temperatura de congelación de una solución que se reduce en proporción directa al número total de partículas libres en la solución. Los valores de referencia de la osmolalidad plasmática medidas por este método oscilan entre 285-295 mosm/kg H<sub>2</sub>O (mmol/kg).

También puede calcularse a través de las concentraciones molares de los tres solutos: Na<sup>+</sup>, glucosa y urea, por la siguiente fórmula:

**OSMOLALIDAD PLASMÁTICA=**

$$2 \times \text{Na}^+ (\text{mEq/L}) + \text{glucosa} (\text{mg/dL})/18 + \text{BUN} (\text{mg/dL})/2,8 = 290-310 \text{ mOsm/kg H}_2\text{O}$$

Referencia:

- El factor 2 (se consideran los iones asociados al  $\text{Na}^+$ : ( $\text{Cl}^-$  y  $\text{HCO}_3^-$ ).
- 1 mOsmol de glucosa equivale a 180 mg /L= 18 mg/dL.
- 1 mOsmol de nitrógeno ureico (BUN) equivale a 28 mg/L = 2,8 mg /dL, peso molecular de dos átomos de nitrógeno en la urea.

La Osmolalidad plasmática sirve de guía para reconocer el reemplazo adecuado de líquidos.

- $>320 \text{ mOsm/Kg H}_2\text{O}$  = cierta alteración neurológica.
- $400 \text{ mOsm/Kg H}_2\text{O}$  = Coma

En ausencia de hiperglucemia o de insuficiencia renal, la osmolalidad del LEC se relaciona directamente con la concentración plasmática de  $\text{Na}^+$  y de sus aniones acompañantes y, a los efectos prácticos, se estima como el doble de la concentración plasmática de  $\text{Na}^+$ .

En determinadas circunstancias otros solutos también pueden contribuir a la osmolalidad plasmática, como el manitol (sustancia de bajo peso molecular) que es administrado en forma terapéutica o la ingestión accidental o voluntaria de metanol, etanol, o etilenglicol. En estos casos, la determinación del “*hiato osmola*”, que es la diferencia entre la osmolalidad medida por un osmómetro y la osmolalidad calculada (VR: hasta 10 mOsm/Kg), es de utilidad en el diagnóstico de pseudo-hiponatremias y tóxicos. Un hiato osmola elevado indica la presencia en el plasma de una sustancia osmóticamente activa que no está incluida en el cálculo de la osmolaridad plasmática.

La **Osmolalidad efectiva** es una medida del movimiento de agua a través de las membranas semipermeables. Está determinada por solutos que no penetran libremente en las células y que son capaces de crear un gradiente osmótico. Estos solutos son el  $\text{Na}^+$  y sus aniones acompañantes, y la glucosa. La urea se considera un osmol no efectivo. La osmolalidad efectiva se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{OSMOLALIDAD EFECTIVA} = 2 \times \text{Na}^+ (\text{mEq/L}) + \text{glucosa} (\text{mg/dL})/18$$

En condiciones fisiológicas, la concentración promedio de todas las sustancias osmóticas en el LEC es de 270-285 mOsm/Kg  $\text{H}_2\text{O}$ , y permanece en equilibrio con el LIC.

El aumento de la osmolaridad efectiva suele indicar un estado de deshidratación, mientras que un descenso generalmente sugiere un estado de hiperhidratación.

## Balance hidrosalino

El balance de agua se ajusta de forma muy precisa a las variaciones en la ingesta, el volumen y la composición de los líquidos corporales, manteniéndose constante y controlado por los mecanismos de la sed y la excreción renal.

Aproximadamente de los 2,6 L de agua ingerida al día por un adulto, alrededor del 85% proviene del agua libre ingerida (la que contiene los propios alimentos), mientras que el resto procede del agua endógena generada por la oxidación de los hidratos de carbono, las grasas y proteínas. Estas entradas son contrarrestadas por la eliminación de agua a través de la orina, heces y las pérdidas insensibles, por la piel y el tracto respiratorio.

De los 1200 mOsm de los solutos ingeridos diariamente, alrededor del 40% corresponde a  $\text{Na}^+$  (150-200 mEq),  $\text{K}^+$  (50-100 mEq) o  $\text{Cl}^-$  contenido en los alimentos; otro 25-30% es urea generada por el metabolismo de las proteínas, y el resto corresponde al  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  incorporados accidentalmente a los alimentos. En condiciones normales, la eliminación diaria de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  es equivalente a las cantidades ingeridas, alrededor de 200 y 100 mEq/día respectivamente.

La mayoría de estos iones se eliminan por la orina. Para ello, la regulación del balance hídrico por parte del riñón, depende básicamente de: **a)** filtrado glomerular (FG), **b)** reabsorción tubular proximal, **c)** reabsorción activa del  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en el asa ascendente de Henle y, **d)** reabsorción del agua en el túbulo colector bajo la influencia de la hormona antidiurética o vasopresina (ADH). Esta hormona y la sensación de sed están sujetas a la osmolaridad plasmática. Un aumento de la osmolaridad secundario a una pérdida de agua del organismo, estimula la sed y la secreción de ADH a través de osmoreceptores en hipotálamo.

En pacientes con diabetes insípida, que cursan con ausencia de ADH pero un mecanismo de la sed intacto y acceso al agua, mantienen la osmolaridad y los niveles séricos de  $\text{Na}^+$  dentro de límites normales a pesar de presentar diuresis de 10 o más litros por día, y difícilmente presentarán hipernatremia o hiperosmolaridad sintomática. Por el contrario, una carga aguda de agua reduce la osmolaridad plasmática, suprime la secreción de ADH endógena y la sed, favorece la formación de orina diluida y la excreción de agua libre (acuaresis). El riñón es capaz de excretar de 15 a 20 L/24 h. La reducción en la capacidad renal de excretar orina después de una gran ingestión de agua sólo ocurre en situaciones que cursan con edema, insuficiencia renal avanzada o síndrome de secreción inadecuada de ADH.

## HOMEOSTASIS Y ALTERACIONES EN EL METABOLISMO SODIO-POTASIO-CLORO (IONOGRAMA)

Los trastornos hidro-electrolíticos son un permanente desafío médico ya que las fluctuaciones de las concentraciones plasmáticas de iones como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , son riesgosas para la vida. Cualquier situación que genere un desequilibrio entre la entrada y salida de agua y electrolitos provocará alteraciones electrolíticas. Éstas pueden surgir de un exceso o defecto absoluto de dichos iones con un nivel de agua corporal normal, o bien, de un exceso o defecto relativo, porque el nivel de agua corporal haya aumentado o disminuido.

### Homeostasis de SODIO

El sodio ( $\text{Na}^+$ ) es el catión extracelular más abundante del organismo, representa el 90% por litro de plasma y el 10% restante a  $\text{K}^+$ , calcio y magnesio. Está asociado con aniones como bicarbonato y  $\text{Cl}^-$ , y es el principal responsable del mantenimiento de la osmolaridad y la distribución acuosa en el LEC. La concentración total de  $\text{Na}^+$  depende de un balance apropiado entre ingesta (dieta) y su eliminación (fundamentalmente renal), y de la regulación de mecanismos como la sed, ADH y el riñón.

El sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRA), para mantener el balance del  $\text{Na}^+$  y agua en el organismo al igual que el volumen sanguíneo y la presión arterial, las células yuxtglomerulares renales, secretan renina como respuesta a la disminución del FG. Esta enzima participa en la vía de formación de angiotensina II, péptido con que posee una potente acción vasoconstrictora y provoca la elevación de la presión arterial en un intento de mejorar el flujo sanguíneo renal. Por otra parte, las glándulas suprarrenales secretan aldosterona, que retiene  $\text{Na}^+$  y excreta  $\text{K}^+$ . El corazón se opone al SRA mediante la secreción de péptido natriurético, lo que produce excreción de  $\text{Na}^+$ . El hipotálamo/hipófisis secretan ADH que permite la retención de agua, que a su vez afecta el estado de tonicidad (concentración de solutos) a nivel corporal.

La mayoría de las alteraciones de la natremia (sodemia) que se presentan en clínica médica no se deben a una alteración del metabolismo del  $\text{Na}^+$ , sino a un trastorno primario en la regulación del agua corporal. Así mismo, las variaciones en la natremia se asocian a la cloremia, por ello es conveniente evaluar en su conjunto las determinaciones plasmáticas de estos electrolitos.

El "volumen circulante arterial efectivo" (VAE) es la porción del LEC que perfunde adecuadamente los tejidos y, en general, varía en forma directa con el volumen del LEC. Cuando se produce un aumento en el volumen de LEC, luego de una carga de  $\text{Na}^+$ , la excreción de sal aumenta en un intento de regresar el volumen a la normalidad. Por el contrario, en presencia de una depleción del volumen del LEC, el riñón retiene  $\text{Na}^+$  para

restablecer el volumen circulatorio efectivo, como ocurre en la restricción de  $\text{Na}^+$ , ortostatismo, cirrosis hepática con ascitis, síndrome nefrótico o insuficiencia cardiaca.

Existen además otros mecanismos regulatorios de las variaciones de VAE que influyen en la eliminación urinaria de  $\text{Na}^+$ , como:

- Flujo sanguíneo extrarrenal (mayor o menor grado de vasoconstricción).
- Aldosterona. Si existe disminución de la presión de perfusión renal, un aumento excesivo de  $\text{Na}^+$  que detecta la mácula densa, o la hiperactividad del sistema simpático, habrá aumento de la secreción de renina y secundariamente de aldosterona.
- Hormona natriurética. Determina una mayor eliminación de  $\text{Na}^+$  por orina, cuando existe una expansión de agua del volumen extracelular. El péptido natriurético atrial (PNA) aumenta la eliminación de  $\text{Na}^+$ , en respuesta a los estímulos que distienden la aurícula derecha.

### Fisiopatogenia del metabolismo de SODIO

La concentración plasmática de  $\text{Na}^+$  oscila entre 138-140 mEq/L, con valores límites de 135-145 mEq/L. Se distinguen estados de:

- **Hiponatremia**, representa una disminución de los niveles de  $\text{Na}^+$  plasmático por debajo de 135 mEq/L. Esto indica que la relación  $\text{Na}^+$ /agua en el plasma está disminuida. Valor crítico menor a 120 mEq/L.

- **Hipernatremia**, implica la presencia de una concentración plasmática de  $\text{Na}^+$  mayor de 145 mEq/L. Valor crítico mayor a 160mEq/L. La excreción urinaria de  $\text{Na}^+$  varía con la dieta dentro de un rango de 40-200 mEq/24 h.

#### ➤ HIPONATREMIA

Es de gran interés clínico, dado que es el desequilibrio electrolítico más frecuentemente observado en pacientes hospitalizados. No solo acompaña a numerosas enfermedades graves, sino que por sí misma puede producir daño cerebral permanente, demencia y muerte. Una depleción genuina en el pool de  $\text{Na}^+$  conduce a deshidratación del espacio extracelular, con uremia, acidosis y colapso (síndrome de falta de sal) y a hiperhidratación intracelular con franca sintomatología neural (astenia, cefalea, convulsiones, vómitos, etc), que puede desorientar al diagnóstico médico.

Es preciso recordar la existencia de **Pseudohiponatremias** (depleciones aparentes pero no reales). Estos casos se deben a la presencia de otras sustancias osmóticamente activas que interfieren en la medición del  $\text{Na}^+$  y no refleja la osmolalidad del plasma. Tal es

el caso de las paraproteinemias (mieloma múltiple), hiperlipidemias, hiperglucemia o administración de manitol.

LAS HIPONATREMIAS SE CLASIFICAN EN:

**A- Hiponatremia por depleción:** el pool de Na<sup>+</sup> total está reducido por déficit de aporte o por pérdida excesiva. Cursan con o sin hipocloremia, y la osmolaridad del plasma está disminuida (deshidratación hipotónica). Presenta sintomatología característica de deshidratación. En general se observa en: vómitos profusos de origen gástrico, fístulas, diarreas, oclusión intestinal, peritonitis y uso excesivo de diuréticos de “asa”. En caso de hiponatremia extrema existe riesgo de edema cerebral.

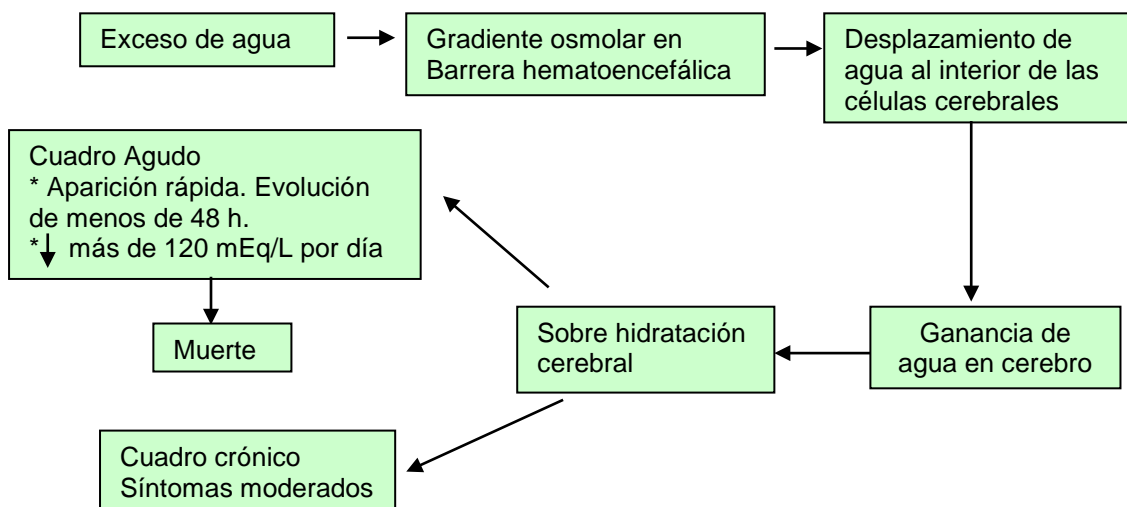
**B- Hiponatremia por Dilución**

**B1- Debida a exceso de agua:** el pool sódico total está aumentado o normal, la osmolaridad plasmática está disminuida (hiperhidratación hipotónica). Se presenta en: forma refractaria al tratamiento de insuficiencia cardiaca grave, cuadros de hipersecreción de ADH, síndrome nefrótico y cuadros con edemas graves.

**B2- Debida a exceso de otros solutos:** Aquí existe expansión del espacio extracelular. Se observa en hiperglucemias diabéticas severas.

**C- Por retención hística de sal:** Suele ser fugaz y de escasa intensidad. Se presenta en algunas enfermedades infecciosas tales como meningitis meningococcica, fiebre reumática, etc. En casos de neumonía tiene interés particular ya que la normalización de la hiponatremia indica mejoría clínica.

**Riesgo de hiponatremia severa**





➤ **HIPERNATREMIA**

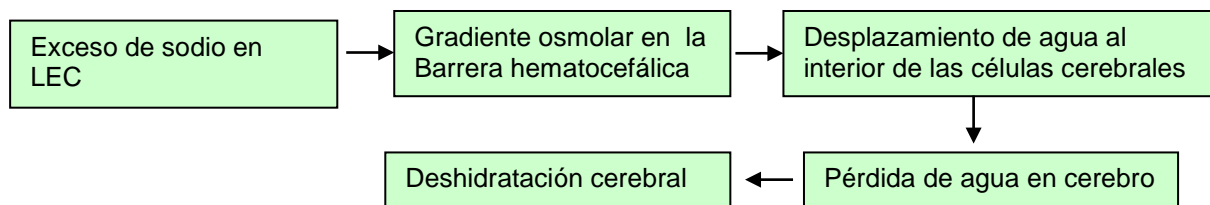
La hipernatremia es menos frecuente y supone una relación  $\text{Na}^+$ /agua plasmática mayor de la normal. En general solo se diagnostica hipernatremia cuando se superan los 150 mEq/L. Puede producirse por diferentes mecanismos: pérdida de agua corporal, ganancia neta de  $\text{Na}^+$ , trasvase de agua extracelular al compartimiento celular y salida de  $\text{Na}^+$  de las células en intercambio por  $\text{K}^+$ . En todos los casos hay salida de agua del espacio celular al extracelular produciendo una disminución del volumen celular. Esta alteración a nivel del sistema nervioso central se manifiesta clínicamente por síntomas neurológicos como letargia, reflejos hiperactivos, temblor muscular, convulsiones y coma.

LAS HIPERNATREMIAS SE CLASIFICAN EN:

**1- Disminución del agua corporal total** (Sinónimos: deshidratación, deshidratación celular). Es la causa más frecuente de hipernatremia. Ocurre por pérdida extrarrenal (piel, pulmones) o renal de agua. A medida que el agua se elimina, la concentración de  $\text{Na}^+$  se eleva y se desarrolla hiperosmolaridad extracelular, que obliga a la salida de agua del espacio intracelular para recuperar el equilibrio osmótico, lo que condiciona deshidratación celular. Este tipo de trastorno se presenta casi siempre en niños, pacientes comatosos o ancianos. También se puede observar por excesiva pérdida líquida (agua > sal): diarreas, quemaduras, diuresis osmótica de la diabetes, diabetes insípida, alcohol, otras.

**2- Aporte excesivo de sodio.** Poco frecuente. Casi siempre es iatrogénica, o por perfusión de soluciones hipertónicas de  $\text{ClNa}$  o bicarbonato sódico o exceso de  $\text{Na}^+$  en la dieta.

**Riesgos de una hipernatremia severa**



La disminución del volumen cerebral provoca ruptura de las venas cerebrales con hemorragias focales intracerebrales, hemorragias subaracnoideas, congestión venosa y capilar y trombosis de los senos venosos.

**Homeostasis de POTASIO (Kalemia)**

El potasio ( $\text{K}^+$ ) es el principal catión intracelular (98%). Los mayores reservorios de  $\text{K}^+$  son el músculo esquelético y el hígado. Menos del 2% del  $\text{K}^+$  se encuentra en el LEC,

constituyendo ésta la única fracción medible en la clínica diaria. La función principal de este ion radica en la generación del potencial de reposo de la membrana celular. Las alteraciones en la concentración plasmática de  $K^+$  traen como consecuencia cambios en la excitabilidad del tejido nervioso, corazón y músculo liso y esquelético. Su concentración intracelular es superior a 120 mEq/L, siendo necesaria para el crecimiento y división celular, síntesis proteica y de ADN, regulación del volumen celular y el estado ácido base intracelular, la concentración extracelular varía entre el 3,5 y 5,5 mEq/L. Variaciones intracelulares de  $K^+$  modifican el pH y afectan indirectamente a los procesos metabólicos y la actividad de numerosas enzimas. El gradiente químico es generado y sostenido básicamente por un proceso de transporte activo -bomba  $Na^+/K^+/ATPasa$ -, y un proceso pasivo y controlado por numerosos factores hormonales y no hormonales. La insulina, los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, los mineralocorticoides y la alcalosis aumentan la captura celular de  $K^+$ , estimulando la actividad de la bomba  $Na^+/K^+/ATPasa$ . En contraste, los agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos, glucocorticoides y la acidosis inhiben la captura celular de  $K^+$ .

Para mantener constante el contenido del  $K^+$  en el organismo es necesario que la excreción sea igual a los aportes. La principal vía de entrada es la absorción intestinal. La excreción se efectúa a nivel renal (del 90 al 95% de lo ingerido) mientras que el resto se elimina por saliva e intestino. Luego de la filtración renal, la mayor parte del  $K^+$  es reabsorbida a nivel de los segmentos proximales, la regulación fina ocurre a nivel del túbulo distal y depende de la concentración de  $Na^+$ , agua y los niveles de aldosterona. Un aumento de  $K^+$  en circulación estimula la liberación de renina y aldosterona, favoreciendo a nivel del túbulo distal la reabsorción de  $Na^+$  y excreción de  $K^+$ .

### **Fisiopatogenia del metabolismo de POTASIO**

La excreción urinaria de  $K^+$  varía con la dieta con un rango medio de 25-125 mEq/24 h. El rango normal de  $K^+$  en plasma es de 3,5-5,5 mEq/L. Tanto el déficit como el exceso de  $K^+$  producen un bloqueo de la conducción de los impulsos.

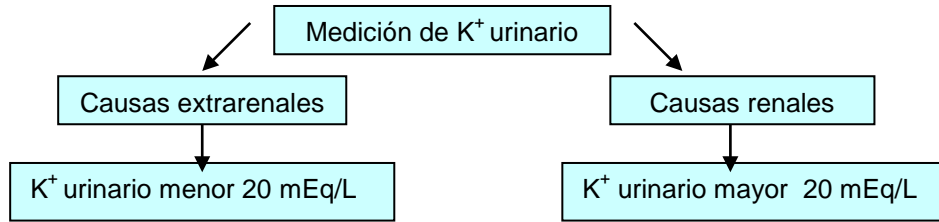
#### **➤ HIPOKALEMIA**

Se considera Hipokalemia a una concentración sérica de  $K^+$  inferior a 3,5 mEq/L. Valor crítico menor a 2,6 mEq/L. Esta es la alteración más frecuente entre pacientes hospitalizados y se manifiesta por astenia muscular que simula parálisis con arreflexia y disfagia. Las principales complicaciones son las arritmias auriculares y ventriculares. Si no es corregida clínicamente conduce a una alcalosis metabólica que empeora el cuadro.

ETIOLOGÍA:

- a) **Pérdidas Digestivas:** vómitos, diarrea (gastroenteritis pediátricas), laxantes.
- b) **Pérdidas Renales:** glomerulonefritis y pielonefritis con IRA, acidosis renotubular, hiperaldosteronismo, diuresis osmótica, hipomagnesemia.

**Diagnóstico diferencial entre pérdidas digestivas y renales**

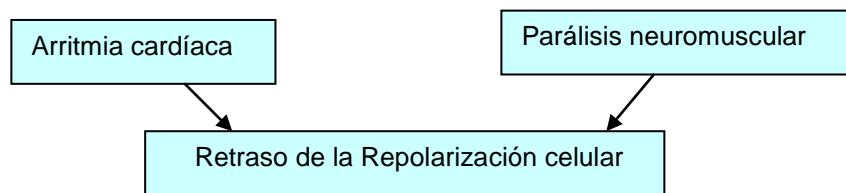


c) **Desplazamiento de K+ hacia el interior de las células:**

- Alcalosis (metabólica o respiratoria) dado que en la compensación fisiológica de este cuadro ocurre salida de H<sup>+</sup> desde el interior celular y el intercambio es con K<sup>+</sup>.
- Administración de drogas tales como insulina, β2-adrenérgicos, cafeína y teofilina que inhiben fosfodiesterasas.

d) **Disminución del ingreso al organismo:** Desnutrición por hipo-aporte, anorexia, bulimia, alcoholismo.

**Riesgos de hipopotasemia**



➤ **HIPERKALEMIA**

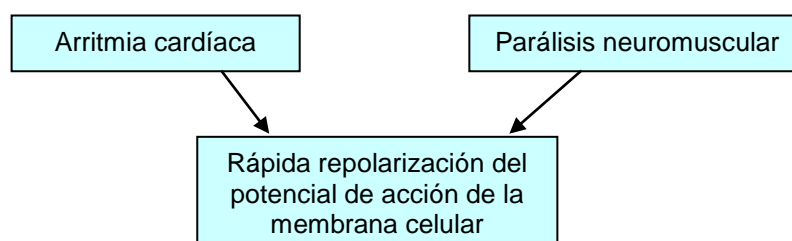
La hiperkalemia normalmente es asintomática y suele ser descubierta en exámenes de laboratorio. Niveles elevados (9-10 mEq/L) producen alteraciones en la excitabilidad con manifestaciones neuromusculares y cardíacas (paro cardiorrespiratorio o fibrilación ventricular). A concentraciones superiores a 6 mEq/L se visualizan signos electrocardiográficos.

Una hiperkalemia confirmada puede ser la consecuencia de tres mecanismos diferentes: 1) exceso de aporte de  $K^+$ , 2) redistribución transcelular de  $K^+$  y 3) disminución de las capacidades de excreción renal de  $K^+$ .

ETIOLOGÍA:

- 1) **Pseudo-hiperkalemias:** éstasis venoso, centrifugación tardía, trombocitosis, leucemia.
- 2) **Excreción renal disminuida:** insuficiencia renal aguda, hipoaldosteronismo, hiperplasia suprarrenal congénita, acidosis tubular renal.
- 3) **Altos ingresos de potasio:** iatrogénica, sobredosis oral o endovenosa de potasio.
- 4) **Redistribución transcelular del potasio:** acidosis metabólica, déficit de insulina, aumento brusco de la osmolaridad plasmática (hiperglucemia), injuria celular grave, lisis celular luego de quimioterapia en leucemia y linfomas, cirugías cardiovasculares.

### Riesgos de hiperpotasemia



### Homeostasis de CLORO (Cloremia)

El cloruro ( $Cl^-$ ) es el anión extracelular más abundante en suero. Su concentración sanguínea está regulada por riñones, glándulas suprarrenales, pulmones, piel, tracto gastrointestinal y el pH sanguíneo. La regulación renal está íntimamente ligada a la resorción de  $HCO_3^-$ , por lo tanto la concentración plasmática de  $Cl^-$  es inversamente proporcional a la de  $HCO_3^-$ . Los valores plasmáticos oscilan entre 95-100mEq/L y los valores en orina entre 100 a 200 mEq/24h. Es conveniente realizar determinaciones simultáneas de natremia a fin de observar paralelismo o disociación. La determinación de la Cloremia es de suma utilidad para el cálculo del **Anión restante (GAP)** y la subsiguiente clasificación de las acidosis metabólicas.

$$\text{Anión GAP} = Na^+ - (Cl^- + HCO_3^-) = 12 \pm 2 \text{ mEq/L}$$

## Fisiopatogenia del metabolismo de CLORO

### ➤ HIPOCLOREMIA

La hipocloremia cuando coexiste natremia, puede conducir a deshidratación y uremia. Se habla de hipocloremia moderada cuando está comprendida entre 90 y 95 mEq/L y grave por debajo de 80 mEq/L. Valor crítico: 75 mEq/L.

Se presenta en los siguientes estados:

- Vómitos abundantes, lavados gástricos o sondas permanentes, diarreas copiosas. Sudoración profusa, acidosis diabética grave, insuficiencia suprarrenal grave (enfermedad de Addison), hiperparatiroidismo grave, quemadura extensa, hipocloremia postoperatoria discreta, alcalosis metabólica, diuréticos, hemodilución.
- La pseudohipocloremia se debe por la utilización de aparatos de medición indirecta por ejemplo autoanalizadores de química o por fotómetros de llama cuando es alta la concentración de lípidos o proteínas.

### ➤ HIPERCLOREMIA

Es una situación clínica poco frecuente y puede presentarse asociada o no al aumento de  $\text{Na}^+$ . Se clasifica en moderada (105 y 115 mEq/L), acentuada (115-125 mEq/L) y grave (125mEq/L). Valor crítico: 125 mEq/L.

Se presenta en los siguientes estados:

#### 1- HIPERCLOREMIA con HIPERNATREMIA:

- a) Hemoconcentración en deshidratación importante de agua pura, sin pérdida de sal: náufragos, hiperventilación en lactantes.
- b) Diabetes insípida nefrogénica.

#### 2- HIPERCLOREMIA sin HIPERNATREMIA:

- a) En acidosis metabólicas ligadas a grandes pérdidas de  $\text{HCO}_3^-$  de origen entérico (fístulas intestinales o diarreas) o de origen renal (acidosis tubular renal).
- b) Uso de solución fisiológica. Esta tiene la misma concentración de sodio y cloro, 155 mEq/L, pero como en sangre hay diferencia en la concentración de sodio y cloro siendo de 4/3 respectivamente, el sodio no se ve afectado pero sí el cloro en sangre.

## DETERMINACION DE ELECTROLITOS EN LIQUIDOS BIOLOGICOS. IONOGRAMA

### Muestra

Para la determinación de electrolitos la muestra debe ser recolectada con material certificado, perfectamente libre de impurezas. Comúnmente se recomienda **suero**, también puede usarse plasma anticoagulado con heparina (sal amónica o de litio). La muestra se debe centrifugar y separar inmediatamente a fin de evitar fuga de potasio desde los eritrocitos. Tanto en la extracción como en la recolección de la muestra de sangre se debe evitar las maniobras que produzcan hemólisis, ya que afecta la cuantificación de potasio e interfiere en la medición de cloremia.

### Metodología

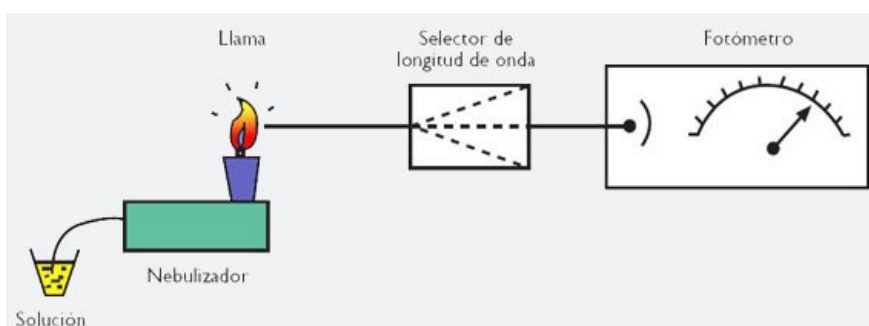
La medición de electrolitos en líquidos biológicos (LCR, suero, plasma, orina, líquido ascítico) se realiza en Bioquímica Clínica mediante la aplicación de dos métodos:

- 1- Fotométricos (**Fotometría de llama**: detección de sodio y potasio)
- 2- Potenciométricos (**Ion selectivo**: detección de sodio, potasio y cloro).

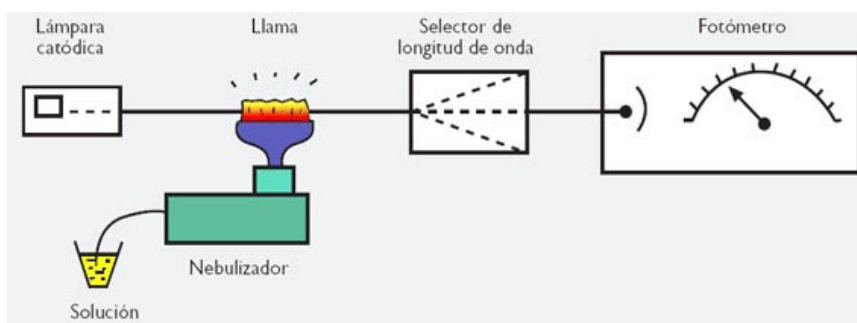
### 1- Fotométricos: FOTOMETRÍA DE LLAMA

Numerosas sustancias al quemarse en una llama emiten luz a una longitud de onda característica, la cual se puede usar para su identificación y la intensidad de la luz emitida se emplea para conocer la concentración de un analito. Este es el principio básico de la fotometría de emisión atómica (convencional). Aquí el calor genera átomos activos produciéndose en la llama la reacción química. En cambio, en la espectrofotometría de llama por absorción atómica, se mide la energía que un átomo puede absorber a una cierta longitud de onda.

#### Fotómetro de llama de emisión atómica



### Fotómetro de absorción atómica



En la fotometría de llama por absorción atómica, una lámpara catódica al vacío construida con el mismo elemento que está siendo medida, emite un rayo de luz monocromático que tiene la misma longitud de onda de la muestra que está pasando por la llama. La señal que se mide es producida por los cambios y fluctuaciones de los átomos que se están quemando y por la energía luminosa que ellos absorben.

Los metales alcalinos y alcalinos térreos son fácilmente excitables mediante una llama. Bajo condiciones controladas, la intensidad de la luz es proporcional al número de átomos que la emiten y por lo tanto al número de átomos presentes en la muestra. Esta proporcionalidad deja de cumplirse para soluciones muy diluidas -por ionización- o muy concentradas, debido a un fenómeno de auto absorción. El  $\text{Na}^+$  produce luz amarilla a 589 nm,  $\text{K}^+$  luz violeta a 766 nm,  $\text{Ca}^{++}$  luz rojo amarillenta a 622 nm y  $\text{Li}^+$  luz roja a 670 nm.

Los componentes básicos de un fotómetro de llama:

1. Dilutor de muestra.
2. Aspirador-atomizador-, el cual sirve para introducir la muestra en la llama.
3. Suministro de gas oxígeno o aire con sistemas de regular presión.
4. Quemador.
5. Sistemas ópticos para aislar la longitud de onda que nos interesa.
6. Célula fotovoltaica para convertir energía radiante en eléctrica.
7. Un sistema para detectar el impulso eléctrico de la fotocelda.

1- Para determinar sodio y potasio se realiza una dilución de la muestra de 1/100 a 1/200 respectivamente, con agua desionizada, para disminuir los efectos de la viscosidad producida principalmente por las proteínas.

2- El atomizador o nebulizador es un dispositivo por medio del cual la muestra se aspira y atomiza y de esta forma es llevado hacia la llama. Esta cámara posee un orificio de drenaje, otro de entrada de aire comprimido, otro de entrada de gas combustible y un capilar de aspiración de muestra. La muestra aspirada pasa a la cámara de expansión, donde luego de

ser atomizada pasa a la llama. En todo momento el atomizador debe suministrar una cantidad constante de muestra.

3- La llama debe mantenerse muy estable, para obtener resultados reproducibles. El quemador es la parte del fotómetro donde se evapora instantáneamente el disolvente y la muestra es gasificada y distribuida homogéneamente por la llama.

4- El sistema óptico de lectura en la mayoría de los aparatos es sencillo, con filtros de vidrio, con amplitudes de banda entre 20 y 60 nm, los de mayor calidad utilizan filtros de interferencia, con amplitudes de banda de 1 y 10 nm; los más refinados utilizan monocromadores con amplitudes de banda menores de 1 nm.

5- Los fotodetectores del fotómetro de llama son análogos a los del espectrofotómetro. Los más usados son los tubos foto multiplicadores en cuanto al dispositivo de lectura consiste en un convertidor de señal analógico digital y un integrador que proporciona el resultado en mEq/L o mmol/L.

6- Algunos fotómetros de llama utilizan la técnica del estándar interno. Los más usados son el de Litio 670 nm y Cesio 455 nm suficientemente alejados de las longitudes de sodio y potasio. Las muestras y patrones se diluyen en una cantidad fija de estándar interno. El fotómetro compara la emisión del elemento que se mide con la del estándar interno y de esta forma, se compensa las variaciones.

## 2- Potenciométricos: ION SELECTIVO

Los componentes de Electroodos Selectivos de Iones (ISE): Figura 1

- a) Electrodo Selectivo
- b) Electrodo de Referencia
- c) Equipo medidor

### Electrodo selectivo

Los electrodos ión selectivos son electrodos que poseen una membrana sensible selectiva a un ión en particular (sodio, potasio, cloro, litio). Cuando se sumerge el electrodo selectivo en la muestra, en su membrana se desarrolla un potencial debido a una reacción selectiva y espontánea. El potencial de cada sensor es medido en relación con un voltaje fijo y estable, establecido por el sensor de referencia de cloro de unión doble plata/cloruro de plata. Un sensor de ión específico genera un voltaje que varía con la concentración del mismo. El potencial desarrollado a través de la membrana selectiva de iones se relaciona en forma logarítmica a la actividad iónica, como muestra la ecuación de Nernst:



$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \cdot \ln c$$

Referencias: **E**: potencial del electrodo. **E°**: potencial en condiciones estándar, que es una característica de cada par que se obtiene en condiciones determinadas. **R**: constante de los gases. **T**: temperatura absoluta (en grados Kelvin). **n**: número de electrones que se intercambian en el proceso. **F**: constante de Faraday. **C**: concentración del ión. **ln**: logaritmo natural.

Se utiliza un método de medida comparativo. Primero, el analizador mide los potenciales generados cuando la muestra es colocada en los sensores y a continuación, se coloca un calibrador A. La diferencia en los dos potenciales es relacionada logarítmicamente a la concentración de iones en la muestra, dividida entre sus concentraciones respectivas en la solución calibradora de concentración conocida.

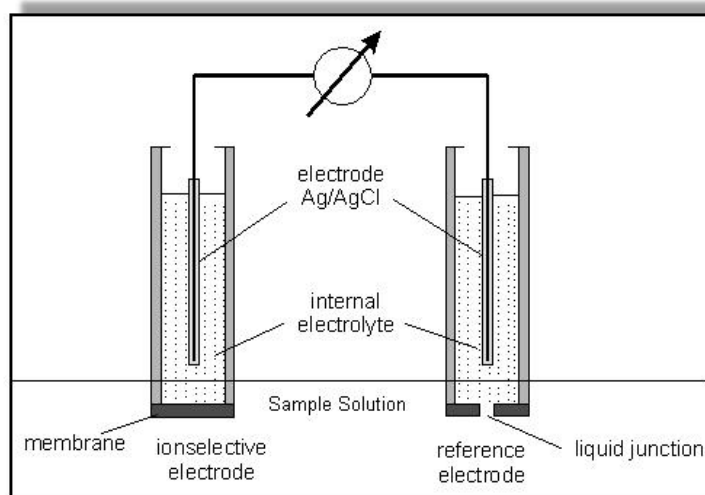


Figura 1. Electrodos Selectivos de Iones (<https://quimica.laguia2000.com>)

### Electrodo de referencia

**(Ag /AgCl)**. Su función es proporcionar un potencial constante frente al que poder medir las variaciones debidas al electrodo indicador. No debe sufrir cambios entre las medidas. Miden lo mismo independiente de la naturaleza de la disolución (muestra). Su función es completar el circuito de medición proporcionando un paso de conductibilidad desde el electrodo sensible, a través de la solución problema hasta el dispositivo de lectura. Es importante seleccionar el electrolito de referencia adecuado, por ello hay que tener en cuenta:

- La fuerza iónica del electrolito debe ser muy superior a la de la muestra.
- Las velocidades del catión y del anión deben ser lo más parecidas posibles.
- No deben reaccionar con la muestra.
- No debe contaminar la muestra. Nunca debe contener el ión a medir.

### Equipo Medidor

- Fuente de voltaje de alta resistencia y microprocesador.
- Mide la diferencia entre un electrodo selectivo y de referencia.
- Almacena datos, elabora y memoriza rectas de calibrado.
- Permite conectar varios electrodos a la vez.

### Variables que afectan

- Temperatura: los patrones y muestras deben estar a la misma temperatura. El potencial desarrollado es proporcional a la temperatura.
- Contaminación: películas de aceite, grasa, proteínas.
- Envejecimiento: electrodo pierde sensibilidad por pérdida de iones de la membrana

En la actualidad, se disponen de instrumentos automatizados para el análisis de electrolitos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Li}^+$ , otros) en suero, sangre total y orina y utilizan como principio el ión selectivo (Figura 2).

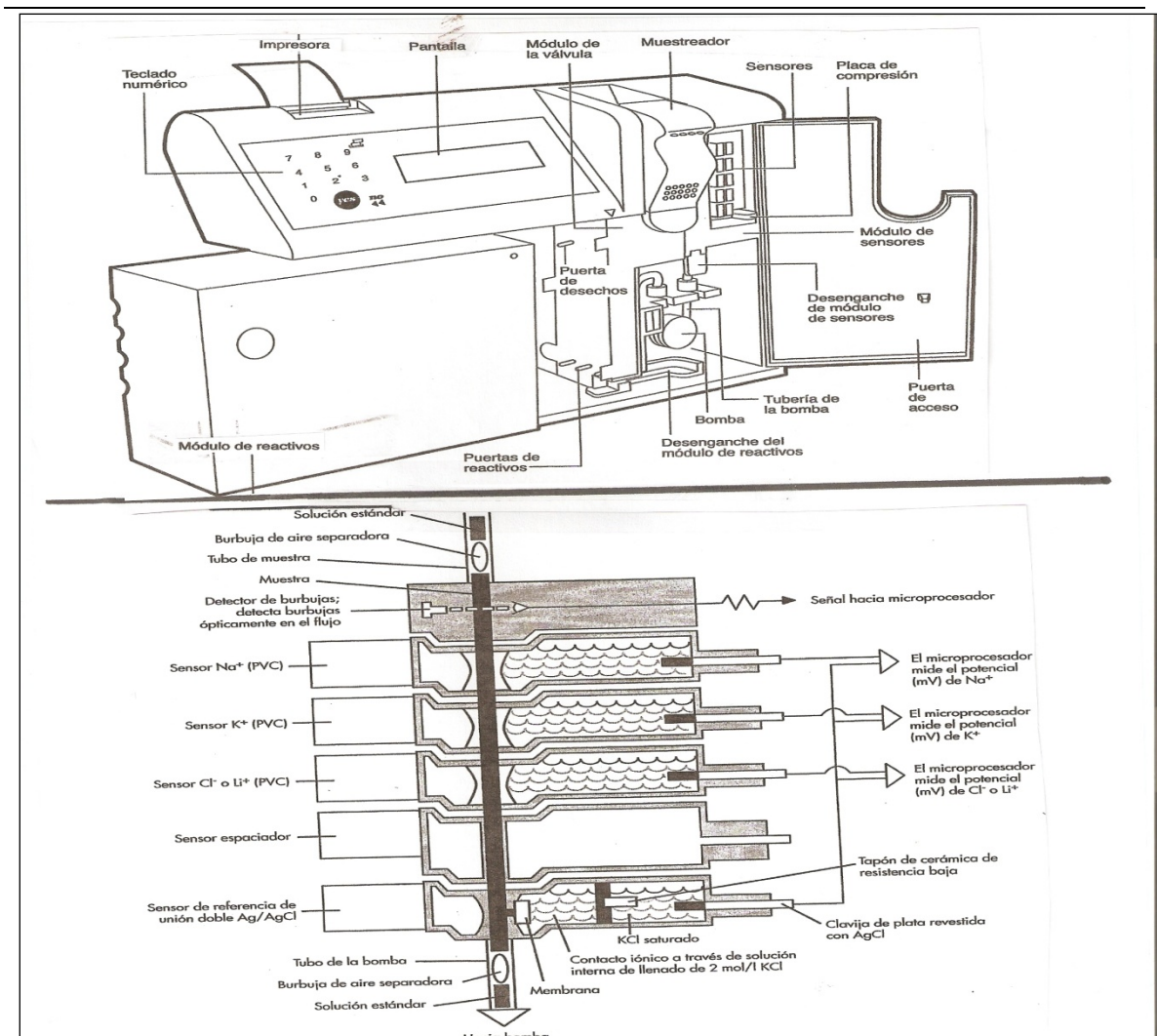


Figura 2. Sistema RAPIDCHEM 744, utiliza la metodología de ion selectivo (ISE).

## ACTIVIDAD PRÁCTICA

### Problemas de Aplicación

1- El Servicio de Terapia de Niños solicita al laboratorio un ionograma a las 7:00 h. El resultado de laboratorio es:  $\text{Na}^+$ : 123 mEq/L,  $\text{K}^+$ : 3,00 mEq/L y  $\text{Cl}^-$ : 106 mEq/L. El médico procede a la corrección del sodio mediante el agregado por vía parenteral de solución fisiológica. Se pide un nuevo control a las 9:00 h:  $\text{Na}^+$ : 156 mEq/L,  $\text{K}^+$ : 3,10 mEq/L y  $\text{Cl}^-$ : 105 mEq/L. Al ver este resultado el laboratorio se comunica con el médico y sugiere una nueva extracción. Los datos obtenidos a las 11:00 h:  $\text{Na}^+$ : 130 mEq/L,  $\text{K}^+$ : 3,06 mEq/L y  $\text{Cl}^-$ : 103 mEq/L.

a) ¿A qué se debe esta discordancia entre los resultados emitidos por el laboratorio?

2- Un paciente ingresa a la Guardia Central, con un cuadro de arritmia cardíaca y parálisis neuromuscular. Se toma muestra para gases en sangre arterial y los valores obtenidos son: pH,  $\text{pCO}_2$ , EB y  $\text{HCO}_3^-$ : aumentados.  $\text{Na}^+$ : 142 mEq/L,  $\text{K}^+$ : 2,85 mEq/L y  $\text{Cl}^-$ : 96 mEq/L.

a) Interprete los resultados obtenidos.

3- Ingresa al Servicio de Urgencia un paciente añoso con un marcado cuadro de deshidratación lo cual dificulta la extracción. Los resultados de las determinaciones bioquímicas solicitadas fueron: glucemia 115 mg/dL (VR: 70-110 mg/dL), uremia 80 mg/dl (VR: 15-40 mg/dL), creatinina 1,8 mg/dL (VR: 0,8-1,4 mg/dL). El médico procede a internar al paciente indicando su hidratación, pide un control de laboratorio para el día siguiente. Los nuevos resultados muestran los valores normalizados.

a) ¿Qué sucedió y a qué se debe este cambio?

4- Un paciente pediátrico ingresa a la guardia por abundantes vómitos, se le realiza una rutina de laboratorio que incluye orina y directo de materia fecal. Como parámetro alterado se observa en el ionograma una marcada disminución en el cloro plasmático. El médico solicita gases en sangre arterial y observa alcalosis metabólica con aumento de  $\text{HCO}_3^-$ .

a) Explique es el mecanismo que lleva al paciente a este estado.

5- Un niño de 5 años ingresa al servicio de pediatría por un cuadro de diarrea. Se solicita análisis de sangre y directo de material fecal, observándose una diarrea infecciosa con moco, pus y sangre. Se interna y se le realiza un coprocultivo. El ionograma arroja un valor de cloro muy elevado. Se le realiza control de laboratorio hasta normalización del paciente.

a) ¿A qué se debe este aumento del cloro plasmático?

**6-** Un paciente anciano diabético llega en estado de coma con un alto grado de deshidratación y es internado en forma urgente en UTI (Unidad de Terapia Intensiva). Se le realizan los siguientes exámenes: Glucemia: 456 mg/dL (VR: 70-110 mg/dL); Cetonuria: no detectable, Na<sup>+</sup>: 165 mEq/L; Urea: 82 mg/dL (VR: 15-40 mg/dL).

**a)** Calcular la osmolalidad y analizar el resultado.

**b)** ¿Qué exámenes complementarios sugeriría y cuál sería el diagnóstico presuntivo del paciente?

**7-** Paciente de 85 años, ingresa a la guardia con los siguientes síntomas: cambio de carácter, náuseas, vómitos, desorientación y letargo. Se encuentra normotensa, afebril y sin signos meníngeos. Esta situación evoluciona con deterioro de la conciencia. La hija refiere que es hipertensa y que desde hace 15 días es medicada con Enalapril e Hidroclorotiazida. No cuenta con análisis recientes, pero los de hace 6 meses indican función renal conservada con ionograma normal. Los estudios de laboratorio de emergencia muestran los siguientes resultados: Hematocrito: normal; Glucemia: 100 mg/dL; Urea: 55 mg/dL; Creatinina: 1 mg/dL; Na<sup>+</sup>: 116 mmol/L; K<sup>+</sup>: 2,7 mmol/L y Na<sup>+</sup> urinario: 79 mmol/L.

**a)** ¿A qué refiere con “función renal con ionograma normal”?

**b)** ¿En vez de mmol/L, se puede expresar en otras unidades el Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>?

**c)** ¿Cuál/es de los parámetros químicos se encuentra alterado y cuál es la posible causa?

**d)** ¿Cuál es el mecanismo que lo produce?

**e)** ¿Por qué se produce la encefalopatía?

**f)** ¿Cuál sería el posible tratamiento?

**8-** Paciente de 32 años que ingresa a UTI por traumatismo craneoencefálico severo con pérdida de conocimiento por accidente de moto. Al ingreso se le realiza una TAC y se observa edema cerebral difuso, evoluciona en coma y sin focalización neurológica. Recibe plan de hidratación con colides y cristalocoloides para aumentar el volumen cardíaco minuto y fármacos vasoactivos para aumentar la presión sanguínea. Se mantiene poliúrico, desarrolla hiponatremia progresiva y presión intracraneana intratable. Los estudios de laboratorio de emergencia muestran los siguientes resultados:

Hematocrito: bajo; Glucemia: normal; Urea y Creatinina: normal; Na<sup>+</sup>: 117 mmol/L; K<sup>+</sup>: 4,3 mmol/L y Na<sup>+</sup> urinario: 110 mmol/L.

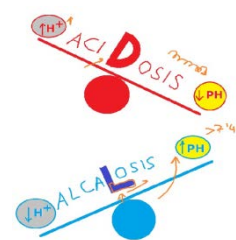
**a)** Interprete el cuadro clínico y analice los resultados obtenidos.

## BIBLIOGRAFÍA

- MEDICINA DE LABORATORIO. FUNDAMENTOS Y APLICACIONES EN EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO. I Antonozzi y E Gulletta. 1ª Edición. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires 2015.
- HARRISON PRINCIPIOS DE MEDICINA INTERNA. DL Longo, AS Fauci, DL Kasper, SL Hauser, JL Jameson, J Loscolzo J. 18ª Edición. Ed. Mc. Graw Hill, España 2012.
- EL LABORATORIO EN EL DIAGNOSTICO CLINICO. JB HENRY. 20ª Edición. Ed. Marbán, España 2010.
- FISIOPATOLOGÍA. SALUD-ENFERMEDAD: UN ENFOQUE CONCEPTUAL. CM Porth. 7ª Edición. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires 2006.
- INTERPRETACIÓN CLÍNICA DEL LABORATORIO G Angel y M Angel. 7ª Edición. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires 2006.

## TRABAJO PRÁCTICO N° 6

### ALTERACIONES DEL EQUILIBRIO ÁCIDO-BASE



#### OBJETIVOS

- Analizar los diferentes mecanismos que regulan el equilibrio ácido-base.
- Interpretar los distintos parámetros de laboratorio que aportan información acerca del estado ácido-base del paciente.
- Reconocer los diferentes trastornos del equilibrio ácido-base y aplicar estos conocimientos a la resolución de problemas (casos clínicos).

#### INTRODUCCIÓN

El medio interno se considera al conjunto de líquidos que circulan y rodean las células. La interpretación de los trastornos del medio interno se organiza en torno a la **gasometría arterial** (GA), que permite analizar de manera simultánea aspectos como ventilación alveolar, equilibrio ácido-base (EAB) y estado de oxigenación del paciente. El equilibrio entre estos factores que se encuentran relacionados, depende de la respuesta integrada de varios sistemas que incluyen principalmente al respiratorio, cardiovascular, hematológico y renal.

El volumen de los líquidos corporales, la concentración de los electrolitos y el EAB se mantienen normalmente dentro de límites muy estrechos a pesar de las amplias variaciones en la ingesta dietética, la actividad metabólica y las exigencias ambientales. En general, cuando se habla del EAB se hace referencia a la regulación homeostática de la concentración de hidrogeniones  $[H^+]$  en los compartimentos de los líquidos corporales.

El metabolismo intermedio genera una gran cantidad de ácidos y el organismo necesita neutralizar y eliminar los  $H^+$  para mantener constante el pH del líquido extracelular (LEC). Para ello dispone de amortiguadores fisiológicos que actúan de forma inmediata impidiendo grandes cambios en la  $[H^+]$ , y de mecanismos de regulación pulmonar y renal.

El método clásico de análisis del EAB describe la relación entre el pH, el bicarbonato plasmático ( $HCO_3^-$ ) y la presión arterial de dióxido de carbono ( $pCO_2$ ) en asociación al exceso/déficit de bases. En pacientes críticos, la evaluación del EAB puede requerir datos en relación a metabolitos (glucosa, lactato, bilirrubina) y electrolitos ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{++}$ ). Se recomienda la determinación rápida y simultánea de todos los analitos utilizando los analizadores multiparamétricos.

Las alteraciones del EAB pueden tener un origen primario pero, en general, derivan de la complicación de una patología preexistente. Deben sospecharse ante la presencia de un

sujeto críticamente enfermo, con signos vitales anormales, alteración del estado de alerta, vómitos, diarrea o cambios en el flujo urinario. La sintomatología muchas veces es inespecífica, está presente en más de un tipo de alteración ácido-base, y puede llegar a confundirse con los signos y síntomas de la enfermedad de base.

### CONCEPTOS BÁSICOS

- **Acidemia y Alcalemia:** valor de pH arterial por debajo de 7,35 o por encima de 7,44 respectivamente.
- **Acidosis:** condición fisiopatológica resultante de la ganancia anormal de H<sup>+</sup> en el organismo o en un compartimiento líquido corporal determinado.
- **Alcalosis:** proceso fisiopatológico causado por una pérdida anormal de H<sup>+</sup> en el organismo o en cualquier compartimiento líquido corporal.

Ambos términos se refieren sólo al proceso primario, sin implicar el resultado final del pH sanguíneo. Un trastorno único débil o el agregado de un segundo proceso opuesto, pueden mantener el pH final en un rango normal, existiendo acidosis o alcalosis en ausencia de acidemia o alcalemia.

- **Alteración Metabólica:** describe un desorden del EAB, iniciado por un aumento o disminución en la concentración de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> plasmático.
- **Alteración Respiratoria:** se refiere a los trastornos del EAB (agudos o crónicos) que se inician por un aumento o disminución de la pCO<sub>2</sub> y se traducen siempre en un estado de hipo- o hiperventilación aunque no conducen al aumento de la síntesis de ácidos volátiles. La magnitud de la excreción de CO<sub>2</sub> es directamente proporcional a la ventilación alveolar.
- **Hiato aniónico** (anión gap, brecha aniónica): Orienta el diagnóstico diferencial de acidosis metabólica. Representa los aniones habitualmente no medidos (proteínas, fosfatos, sulfatos). Se halla mediante la diferencia entre las cargas positivas (cationes) y negativas (aniones) del plasma.

$$\text{Hiato aniónico} = [\text{Na}^+] - ([\text{Cl}^-] + [\text{HCO}_3^-])$$

- **Gap Osmolar:** Corresponde a la osmolaridad real medida por un osmómetro menos la osmolaridad calculada. Contribuye al diagnóstico de acidosis metabólica asociada a la ingesta de alcoholes.

$$\text{Gap Osmolar: } 2\text{Na}^+ + \text{Glucemia}/18 + \text{BUN}/2,8$$

Cuadro 1: Valores de referencia de parámetros implicados en el EAB (niños mayores y adultos)

	Sangre Arterial	Sangre Venosa
pH	7,36-7,45	7,35-7,45
pCO <sub>2</sub> (mmHg)	35-44	40-45
pO <sub>2</sub> (mmHg)	85-97	30-50
CO <sub>3</sub> H <sup>-</sup> (mEq/L)	22-26	24-28
EB (mEq/L)	0,0 ± 2	0,0 ± 2

### Fuentes de Ácidos

Los ácidos endógenos derivados de la transformación de constituyentes comunes de la dieta o de los tejidos corporales, como también factores que alteran el ritmo del metabolismo, pueden llevar a alteraciones en el ingreso de H<sup>+</sup>.

- 1- Ácidos volátiles (15.000 mmol/día): ácido carbónico (CO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> = CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O), producto final del metabolismo celular oxidativo. Eliminación pulmonar.
- 2- Ácidos fijos o no volátiles (50-100 mmol/día): eliminación renal.
  - Sulfatos: catabolismo oxidativo de aminoácidos azufrados (metionina - cisteína).
  - Ácido fosfórico: hidrólisis de ésteres fosfóricos, degradación de fosfoproteínas, nucleoproteínas, etc.
  - Ácidos orgánicos: la combustión incompleta de ciertas grasas, hidratos de carbono y proteínas puede originar productos finales del metabolismo (ácido úrico y creatinina) o metabolitos intermedios (ácido láctico).

### Sistemas de compensación ante un disturbio del estado ácido-base

Para mantener el pH dentro de límites fisiológicos debe existir un equilibrio entre el aporte o producción de hidrogeniones y su amortiguamiento o eliminación. Esta [H<sup>+</sup>] es amortiguada inicialmente por las sustancias tampones o *buffers* presentes en los líquidos intracelular (LIC) y LEC, luego por la compensación respiratoria y la posterior intervención de los riñones permite la regulación del EAB. La potencia y el tiempo de acción de los componentes del sistema de amortiguamiento se resumen en el cuadro 2:



Cuadro 2: Amortiguadores que actúan en los disturbios del EAB

Sistemas de amortiguamiento	Potencia	Tiempo
Plasmático	++	Inmediato
Respiratorio	++++	1-3 min
Renal	++++++	12-48 h

**1- Amortiguación plasmática:** Un sistema buffer es una solución de un ácido débil y su base conjugada. En el LEC, el buffer principal es proporcionado por el sistema bicarbonato/ácido carbónico ( $\text{CO}_3\text{H}^- + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{CO}_3\text{H}_2 \leftrightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ ) en donde el  $\text{H}^+$  se une al  $\text{CO}_3\text{H}^-$  en forma reversible. Cuando el aporte o la producción de  $\text{H}^+$  aumentan, la reacción se desplaza hacia la derecha incrementando la cantidad de  $\text{H}^+$  captados por el amortiguador, y así se minimizan los cambios en el pH.

La amortiguación intracelular en el espacio vascular está a cargo de la Hemoglobina (Hb) de los eritrocitos. En casos de anemia severa este sistema se reduce notablemente. En otras células, los buffers más importantes son el fosfato y las proteínas. El tejido óseo es un reservorio buffer que se utiliza en estados de retención crónica de ácido, no así en las alteraciones agudas del estado ácido-base.

**2- Centro respiratorio:** La  $\text{pCO}_2$  es una variable muy dinámica que depende de su producción tisular y de la ventilación alveolar. La disminución del pH actúa estimulando quimiorreceptores en el tallo cerebral, con el consecuente incremento en la ventilación minuto y eliminación del  $\text{CO}_2$ . Así mismo, ante situaciones de hipoxia tisular, se activan los sensores presentes en los cuerpos carotídeos del cayado aórtico para promover la hiperventilación.

**3- Sistema renal:** El riñón regula la concentración de  $\text{H}^+$  en los líquidos corporales excretando orina ácida o básica según sea necesario a través de sistemas reguladores que involucran la secreción de iones  $\text{H}^+$ , reabsorción de  $\text{CO}_3\text{H}^-$  filtrado y producción de nuevos iones  $\text{CO}_3\text{H}^-$ . Los ácidos no volátiles se excretan exclusivamente por riñón a través de mecanismos complejos, debido a que el pH mínimo urinario es de 4,5 y, en consecuencia, no es posible su eliminación sin la intervención de los sistemas amortiguadores de dicho órgano. Los  $\text{H}^+$  se eliminan en forma de **acidez titulable o amonio** ( $\text{NH}_4^+$ ). Este proceso se logra mediante el intercambio tubular  $\text{H}^+/\text{Na}^+$ , por un lado, permite su titulación por buffers como el fosfato, y por otro favorece la difusión del amoniaco ( $\text{NH}_3$ ) desde las células tubulares a la luz del túbulo, donde reacciona con  $\text{H}^+$  para formar  $\text{NH}_4^+$  (Figura 1).

Así mismo, el **hígado** contribuye en la neutralización de las bases fuertes generadas en el catabolismo de los aminoácidos a través del ciclo de la ureogénesis. A su vez, el **tracto gastrointestinal** posee un enorme potencial para alterar el balance de  $H^+$  en ciertas enfermedades. La pérdida de secreciones que contengan  $H^+$  (jugo gástrico) o  $CO_3H^-$  (secreción pancreática o del intestino delgado), pueden alterar las reservas de  $CO_3H^-$ .

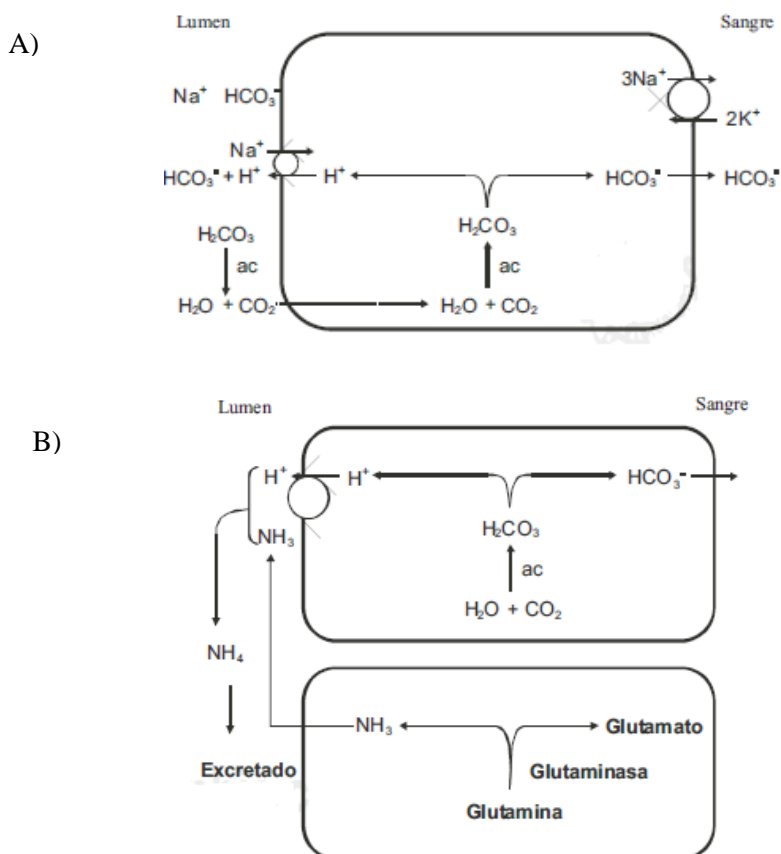


Figura 1: A) Reabsorción de  $CO_3H^-$  filtrado en el túbulo contorneado proximal. B) Excreción de amonio (ac: anhidrasa carbónica). ([www.basesmedicina.cl/nefrologia](http://www.basesmedicina.cl/nefrologia))

### Monitoreo de la Oxigenación

Para lograr el EAB se requiere mantener el circuito de la respiración a fin de suministrar  $O_2$  a los tejidos y eliminar  $CO_2$ , por ello es necesario que exista integridad entre los diferentes elementos que constituyen el aparato respiratorio: automatismo respiratorio, mecánica ventilatoria, permeabilidad de la vía aérea y funcionalidad de la unidad alveolo-capilar (Cuadro 3).

La **hipoxemia** es un déficit relativo de la tensión de  $O_2$  en la sangre arterial, definido como una  $PO_2 < 80\text{mmHg}$  a nivel del mar en un adulto que respira aire ambiental (21% de  $O_2$ ). Los principales mecanismos relacionados con la hipoxemia son:

**a)** hipoxemia hipobárica: asociada a las alturas y a individuos que respiran aire hipóxico, como sucede en los incendios; **b)** hipoventilación: es el único mecanismo de hipoxemia que cursa con gradiente alveolo-arterial de oxígeno normal, las principales causas son: hipoventilación central, defectos de caja torácica o enfermedades que afectan la función neuromuscular; **c)** desequilibrio ventilación/perfusión: es el mecanismo más frecuente de hipoxemia; **d)** trastornos de la difusión de oxígeno (principalmente en las enfermedades que afectan el intersticio pulmonar); **e)** cortocircuito (alvéolos que reciben perfusión, pero no se encuentran ventilados); **f)** desaturación de sangre venosa mixta (la sangre de la arteria pulmonar está *desaturada* es decir, en un estado hiperdinámico con tiempo de tránsito acortado como sucede en la etapa hiperdinámica de la sepsis, imposibilita que la sangre se oxigene apropiadamente durante su paso por el alvéolo.

La utilidad práctica de la GA es de vital importancia en la atención de pacientes mecánicamente ventilados y en el diagnóstico de la insuficiencia respiratoria.

Cuadro 3: Valores de referencia de los distintos parámetros de oxigenación

	Unidades	VR
Sat. O <sub>2</sub>	%	95-98
cto O <sub>2</sub>	mL/dL	15-23
pO <sub>2</sub>	mmHg	>85
pO <sub>2</sub> (A-a)		0,85-0,95
PaFi (pO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> )	mmHg	350-400

Referencias:

**pO<sub>2</sub>**: Indicador de la oxigenación arterial y monitoreo de la captación pulmonar de O<sub>2</sub>.

**pO<sub>2</sub> (A-a)**: Gradiente alveolo-arterial de O<sub>2</sub>. Marcador del intercambio gaseoso: indica qué porcentaje del aire alveolar ha llegado a la arteria.

**PaFi (pO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>)**: Parámetro de captación pulmonar de oxígeno.

**Sat. O<sub>2</sub>**: Saturación funcional de oxígeno en sangre arterial (medición gasométrica)

**cto. O<sub>2</sub>**: Contenido de oxígeno en sangre arterial. Marcador de la habilidad de la sangre para suministrar oxígeno a los tejidos.

### Cooximetría: la Hemoglobina (Hb) y sus variantes

La disociación del oxígeno de la Hb tiene una curva muy característica que posibilita la captación de O<sub>2</sub> en los alvéolos pulmonares y el cese en condiciones anaerobias. Esta disociación está bajo la influencia de la pO<sub>2</sub>, el pH y el 2,3 difosfoglicerato. La concentración de hemoglobina total (ctHb) es una medida de la capacidad potencial total de transporte de oxígeno. Según las modificaciones químicas o ambientales que se produzcan en su estructura, se denominan los distintos derivados de la Hb, siendo los más importantes:

oxihemoglobina (O<sub>2</sub>Hb), deoxihemoglobina (HHb), carboxihemoglobina (COHb), metahemoglobina (MetHb) y sulfohemoglobina (SHb). La capacidad efectiva de transporte de oxígeno corresponde a la suma de O<sub>2</sub>Hb y HHb. Las demás fracciones se conocen como dishemoglobinas y no son capaces de realizar esta función en forma eficaz.

La **cooximetría** es una técnica espectrofotométrica, en la cual la Hb y sus fracciones presentan picos de absorbancia a longitudes de onda específicas y por tanto tienen un espectro característico que sigue la ley de Lambert-Beer. Así, después de hemolizar la muestra de sangre los resultados de las absorbancias medidas a múltiples longitudes de onda son utilizadas por un *software* para calcular la concentración de cada derivado de la Hb (O<sub>2</sub>Hb, HHb, COHb, MetHb, SHb). El rango de absorción es 520-620 nm. La ctHb es calculada a través de la suma de los derivados (Figura 2).

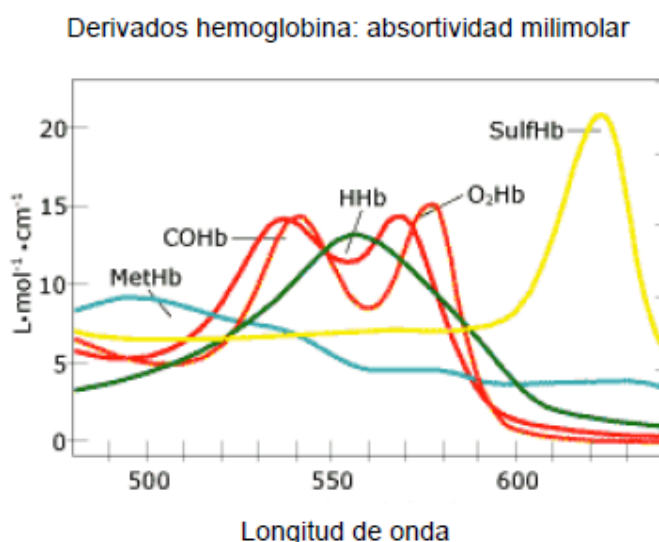


Figura 2: Espectros de absorción de cantidades equimolares de los derivados de la hemoglobina (<http://gsdl.bvs.sld.cu>)

La fracción de oxihemoglobina: ( $FO_2Hb (\%) = c_{O_2Hb}/ctHb \times 100$ ) hace referencia al porcentaje de Hb con Fe<sup>2+</sup> unida al oxígeno de forma reversible con respecto al total de hemoglobinas presentes (incluidas las dishemoglobinas). La saturación de oxígeno (sat. O<sub>2</sub>) es la fracción de hemoglobina oxigenada en relación con la cantidad de hemoglobina capaz de transportar oxígeno: **sat. O<sub>2</sub> = c<sub>O<sub>2</sub>Hb</sub> / (c<sub>O<sub>2</sub>Hb</sub> + c<sub>HHb</sub>) x 100**. Los valores de referencia en el adulto en sangre arterial son 94-98%. Como la mayoría de los pacientes no presentan niveles significativos de dishemoglobinas (COHb, MetHb, SHb), ambas, FO<sub>2</sub>Hb y sO<sub>2</sub> suelen ser similares. La relación entre la FO<sub>2</sub>Hb y la sat.O<sub>2</sub> medida es:  $FO_2Hb = sO_2 \times (1 - FCOHb -$

FMetHb). De esta forma, en caso de existir una dishemoglobinemia, disminuye FO<sub>2</sub>Hb, pero no la satO<sub>2</sub>.

La sat.O<sub>2</sub> puede calcularse a partir de la presión parcial de oxígeno medida y una ecuación basada en la curva de disociación de oxígeno, con corrección por temperatura, pH y pCO<sub>2</sub>. Sin embargo, se recomienda informar la sat. O<sub>2</sub> medida por cooximetría en detrimento de la calculada, debido a que en esta última se consideran una serie de parámetros normales (ctHb, ausencia de dishemoglobinas y Hb fetal) que podrían no ser ciertos y ocasionar un error en la valoración del estado de oxigenación del paciente.

Determinadas situaciones clínicas agudas o críticas requieren la medición en sangre del contenido de oxígeno y de la saturación de oxígeno de la hemoglobina para ayudar a la valoración del intercambio pulmonar gaseoso, a su transporte y a la utilización del oxígeno por los tejidos. Las principales indicaciones son:

1. La posible presencia o severidad de la enfermedad o disfunción pulmonar y/o cardíaca.
2. La cianosis observada en el examen físico (o por la historia).
3. La historia o sospecha de exposición aguda o crónica a CO o a materiales tóxicos/terapéuticos que interfieren con las interacciones oxígeno/hemoglobina.

## TRASTORNOS DEL EQUILIBRIO ÁCIDO-BASE

Un trastorno ácido-base **simple** se define como una única alteración primaria y unidireccional del parámetro respiratorio (pCO<sub>2</sub>) o del metabólico (CO<sub>3</sub>H<sup>-</sup> en plasma), acompañado de una respuesta compensadora generada por el otro parámetro. Si el valor de la respuesta compensadora no es el esperado, es probable que exista un **disturbio mixto** (Cuadro 4).

Cuadro 4: Trastornos simples del EAB

Tipo de Trastorno	pH	pCO <sub>2</sub>	CO <sub>3</sub> H <sup>-</sup>
Acidosis metabólica	↓	↓(compensación respiratoria)	↓(cambio 1°)
Alcalosis metabólica	↑	↑(compensación respiratoria)	↑(cambio 1°)
Acidosis respiratoria	↓	↑(cambio 1°)	↑(compensación metabólica)
Alcalosis respiratoria	↑	↓(cambio 1°)	↓(compensación metabólica)

## ACIDOSIS RESPIRATORIA (AR)

En condiciones fisiológicas, la pCO<sub>2</sub> arterial se mantiene en un nivel cercano a **40 mmHg** a través del equilibrio entre la producción de CO<sub>2</sub> por el metabolismo celular y su eliminación por la ventilación alveolar. La AR es un desorden ácido-base primario

caracterizado por aumento en la  $p\text{CO}_2$  debida a hipoventilación, elevación variable de la concentración plasmática de bicarbonato como respuesta compensadora, y tendencia a la disminución del pH arterial.

La AR puede ser ocasionada por:

- Obstrucción de las vías aéreas: cuerpo extraño, laringoespasma o broncoespasma.
- Depresión del centro respiratorio: anestesia general, sobredosis de sedantes o narcóticos, traumatismo, accidente cerebrovascular agudo, tumores.
- Colapso circulatorio: paro cardiorespiratorio, edema agudo de pulmón.
- Causas neurogénicas: lesión de la columna cervical, síndrome de Guillán-Barré, crisis miasténica, toxinas, poliomielitis, esclerosis múltiple.
- Defectos restrictivos: neumotórax, edema, obesidad, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

En la **AR Aguda**, el mecanismo compensatorio -poco eficaz-, se limita a la amortiguación celular por proteínas y hemoglobina. Con el correr de las horas, la acidosis y el aumento de la  $p\text{CO}_2$  estimulan al riñón para que aumente la excreción de  $\text{H}^+$  en forma de  $\text{NH}_4^+$  y de acidez titulable y consecuentemente, aumenta la reabsorción renal de bicarbonato. Dicho proceso se completa en 3-5 días (**AR Crónica**). Cabe destacar que para mantener la electroneutralidad, las acidosis respiratorias son hipoclorémicas.

### **ALCALOSIS RESPIRATORIA (ALcR)**

La AlcR se caracteriza por una disminución de la  $p\text{CO}_2$  debida a hiperventilación, disminución variable de la concentración plasmática de bicarbonato como respuesta compensadora, y tendencia a la elevación del pH arterial. Este cambio del pH se amortigua inmediatamente por la acción de los sistemas buffers (Hb, proteínas plasmáticas y lactato), los cuales liberan hidrogeniones que disminuyen el  $\text{CO}_3\text{H}^-$  del plasma (**AlcR Aguda**). En las formas **crónicas**, se reduce la excreción renal de  $\text{H}^+$ , causada en parte a la elevación del pH en las células tubulares renales, lo que provoca un aumento de la excreción de bicarbonato. Este mecanismo se inicia en pocas horas y se completa en 2-3 días. La AlcR puede derivar de la presencia de hipoxemia o hipoxia tisular -por estímulo de los quimiorreceptores periféricos o centrales, y de los mecanorreceptores de las vías aéreas- o del estímulo directo del centro respiratorio. Puede observarse en presencia de:

- Hipoxemia: enfermedades pulmonares (edema pulmonar, fibrosis pulmonar, asma bronquial, neumonía, tromboembolismo de pulmón), insuficiencia cardiaca congestiva, hipotensión y/o anemia, permanencia en grandes alturas.
- Estímulo directo del centro respiratorio: hiperventilación psicógena o voluntaria, ansiedad o dolor, insuficiencia hepática, sepsis, hipertiroidismo, intoxicación por fármacos

(salicilatos, topiramato, teofilina, catecolaminas), embarazo, trastornos neurológicos (infecciones, traumatismos, tumores).

- Inadecuado uso de la ventilación mecánica.

### ACIDOSIS METABÓLICA (AM)

La AM es una alteración clínica en la que existe un pH arterial bajo como consecuencia de una disminución en la concentración plasmática de bicarbonato. En forma compensadora, se produce también un descenso de la  $p\text{CO}_2$  por hiperventilación que tiende a amortiguar la caída del pH, se estimula el centro respiratorio y los quimiorreceptores periféricos, aumentando la frecuencia respiratoria y promoviendo la excreción de  $\text{CO}_2$ .

Desde el punto de vista fisiopatológico, los mecanismos fundamentales involucrados en la génesis de la AM son por: **a)** aumento de ácidos no volátiles (por falta de eliminación renal, incremento de su producción endógena o aporte exógeno) y **b)** pérdidas -digestivas o renales- de bicarbonato.

Existen numerosas causas de acidosis metabólica, las cuales suelen ser clasificadas, según el Anión GAP en 2 grupos:

- **AM con Anión Gap elevado o Normoclorémicas:** por acúmulo de ácidos. Cetoacidosis diabética (por ayuno o alcohólica), acidosis láctica, insuficiencia renal, intoxicaciones (salicilatos, etanol, etilenglicol, metanol, formaldehído, tolueno), rabdomiólisis. En pacientes con AM en intoxicaciones con metanol o etilenglicol, así como también en la falla renal crónica avanzada, el valor del *Gap Osmolar* se encuentra elevado.

- **AM con Anión Gap normal o Hiperclorémicas:**

- Pérdidas digestivas de bicarbonato: diarrea, fístulas pancreáticas, biliares o intestinales.
- Pérdidas renales de bicarbonato: acidosis tubular renal (ATR), hiperparatiroidismo primario, fármacos (acetazolamida, anfotericina, ciclosporina, diuréticos distales).

La **Acidosis láctica** representa la causa más común de Anión Gap elevado. Cuando la disponibilidad de oxígeno no satisface el consumo o existe una perfusión tisular inapropiada, se activa el metabolismo anaerobio, que origina un aumento de lactato,  $\text{H}^+$  y fosfatos inorgánicos a nivel circulante, y conduce a una acidosis láctica. La tasa de producción de  $\text{H}^+$  condiciona la gravedad de la acidosis, que es máxima en la acidosis láctica por hipoxia.

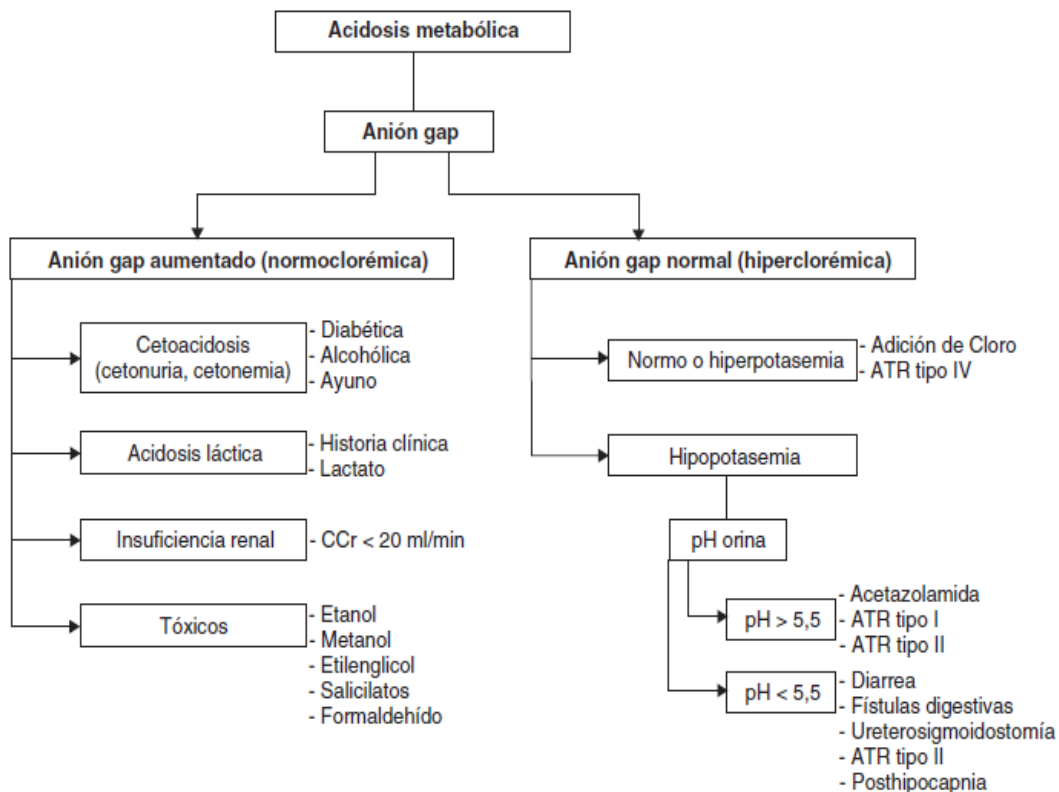
Se clasifica en dos tipos:

- *Tipo A:* Por hipoperfusión, se observa en envenenamiento con monóxido de carbono y enfermedad pulmonar generando hipoxia hística. Ocurre por alteración de la cadena oxidativa mitocondrial que no regenera  $\text{NAD}^+$  y se asocia con una elevada mortalidad.

- *Tipo B:* A su vez puede ser de tres tipos: **B1:** se asocia con trastornos sistémicos graves como falla hepática, diabetes mellitus, neoplasias, convulsiones, sepsis severa; **B2:** se

relaciona con fármacos o toxinas: biguanidas, nutrición parenteral, etanol, salicilatos, metanol, etilenglicol y uso de catecolaminas (sobre todo adrenalina por incrementar la glucólisis hepática) y **B3**: se corresponde con errores congénitos del metabolismo.

La AM suele acompañarse de déficit importante de  $K^+$ , tanto por pérdidas digestivas (diarrea) como renales (cetoacidosis). Sin embargo, el exceso de  $H^+$  conlleva a un intercambio del mismo al interior celular por la salida del  $K^+$  al espacio extracelular. El resultado es un aumento variable de la  $[K^+]$  de 0,2 a 1,7 mEq/L por cada descenso de 0,1 en el pH arterial.



Diagnóstico diferencial de Acidosis Metabólica (Diálisis y Transplante 2012; 33:25-34).

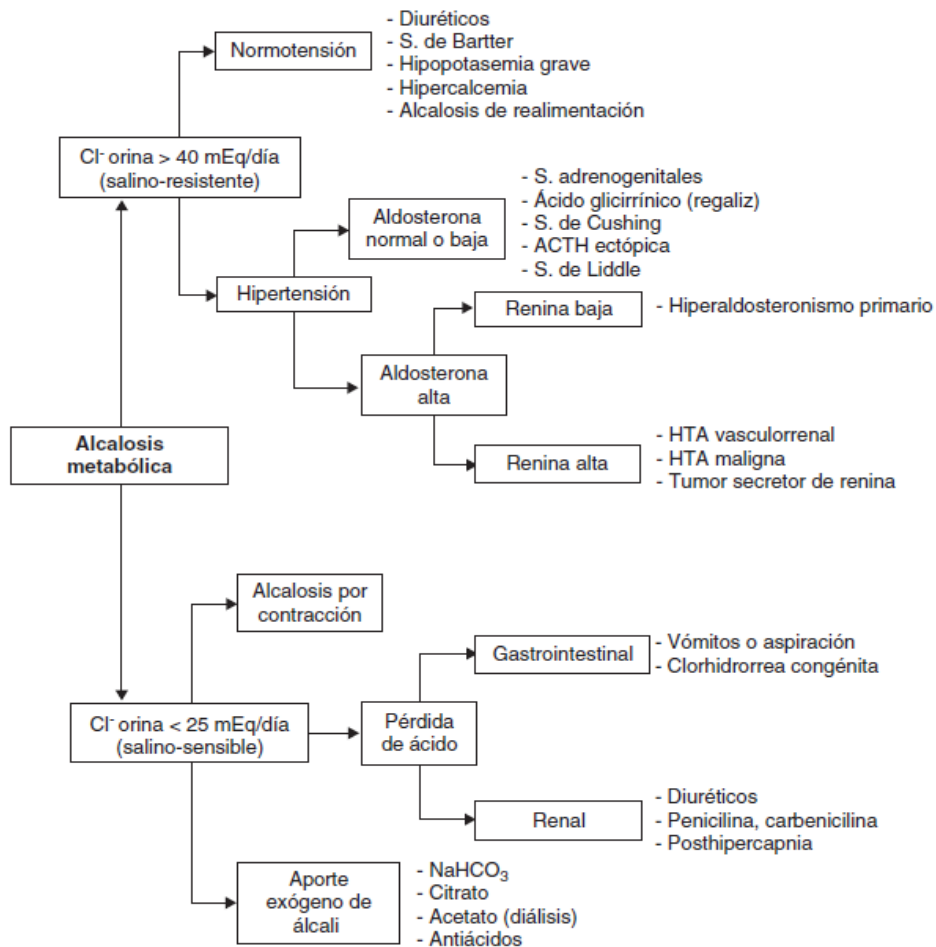
### ALCALOSIS METABÓLICA (ALCM)

La AlcM es un trastorno caracterizado por aumento de la concentración plasmática de bicarbonato, aumento de la  $pCO_2$  por hipoventilación compensatoria, y tendencia al aumento del pH arterial. La AlcM induce liberación de  $H^+$  por parte de los tampones intracelulares y, posteriormente, hipoventilación por inhibición del centro respiratorio debida al descenso de  $H^+$ . La alcalosis metabólica obedece a tres causas principales:

- Pérdida excesiva de hidrogeniones:



- Origen digestivo: vómitos, aspiración nasogástrica, antiácidos orales, diarrea con pérdida de  $\text{Cl}^-$ , hipopotasemia).
- Origen renal: diuréticos de asa, hiperaldosteronismo primario o secundario, alcalosis post-hipercapnia.
- Exceso de  $\text{CO}_3\text{H}^-$  en el LEC: administración exógena, transfusiones, aumento de la reabsorción renal secundaria a hipopotasemia o hiperaldosteronismo.
- Contracción del volumen del LEC: por el uso de diuréticos de asa o tiazidas.



Diagnóstico diferencial de alcalosis metabólica (Diálisis y Transplante 2012; 33:25-34).

La capacidad renal para excretar el exceso de bicarbonato es grande. Ello explica que la AlcM solo se perpetúe cuando coexisten circunstancias en las que esté aumentada la reabsorción renal de bicarbonato (disminución del volumen extracelular, hipocloremia, hipopotasemia o hiperaldosteronismo). Para estudiar la contracción de volumen en la AlcM es de utilidad la determinación de concentración de  $\text{Cl}^-$  urinario. Así, la AlcM puede clasificarse en salino-sensible ( $\text{Cl}^- \text{ u} < 25 \text{ mEq/día}$ ), con buena respuesta a la reposición de volumen; y salino-resistente ( $\text{Cl}^- \text{ u} > 40 \text{ mEq/día}$ ), sin respuesta a dicha terapia.

La AlcM influye de manera negativa en el transporte de  $O_2$ . Al aumentar la fracción de calcio unida a albúmina y disminuir el calcio iónico, se reduce el gasto cardíaco por alteración de la contractibilidad miocárdica. La curva de disociación de Hb se desvía a la izquierda (*efecto Bohr*) y disminuye la capacidad de liberar  $O_2$ . Así mismo, la alcalosis aumenta la glucólisis intracelular, incrementando los requerimientos de  $O_2$ . Estos hechos son de vital importancia en pacientes con shock que evolucionan con alcalosis metabólica (Figura 3).

“En general, en los disturbios metabólicos no se habla de formas agudas o crónicas, ya que el ajuste primario que realiza el pulmón es más rápido respecto al del riñón”.

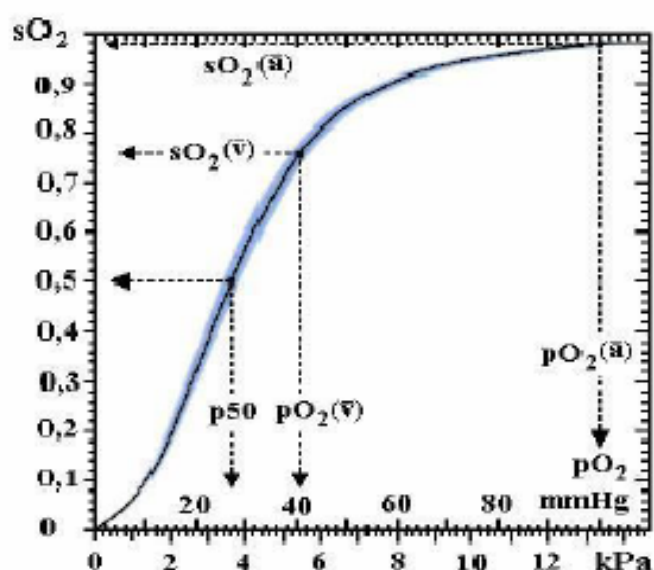


Figura 3: Curva de disociación del oxígeno por la hemoglobina (CDOHb), la p50, las saturaciones arteriales y venosas (<http://gsdl.bvs.sld.cu>).

### CONSIDERACIONES PRE-ANALÍTICAS EN EL ESTADO ÁCIDO-BASE

Los resultados de los análisis de gases sanguíneos son susceptibles de sufrir diversos tipos de errores pre-analíticos debido a una praxis incorrecta en la obtención y manipulación de la muestra, así como en la preparación previa del paciente. En el proceso de recolección de la muestra, se debe prestar atención a los procedimientos básicos de identificación del paciente y procedencia del espécimen (arterial, venoso o capilar).

- **Preparación del paciente:** Es importante que el paciente esté en reposo y relajado durante la toma de muestra (la hiperventilación aumenta el pH y la  $pO_2$  y disminuye la  $pCO_2$ , mientras que la hipoventilación genera una disminución del pH y la  $pO_2$  y aumenta la  $pCO_2$ ). En caso de pacientes internados, debe conocerse la fracción inspirada de oxígeno ( $FiO_2$ ).

- **Toma de Muestra:** La sangre debe recogerse en condiciones anaerobias para impedir el intercambio de gases con el aire circundante y debe sellarse el contenedor para asegurar el mantenimiento de la anaerobiosis. La contaminación de la jeringa con burbujas de aire disminuye la  $p\text{CO}_2$  y aumenta el pH y la  $p\text{O}_2$ . Este efecto es mayor cuanto mayor es la superficie de contacto aire/sangre (burbujas pequeñas y múltiples). Es vital la correcta homogeneización del espécimen; muestras sedimentadas poseen valores ficticios de Hb mientras que la agitación demasiado vigorosa genera hemólisis. Se recomienda rechazar la muestra ante la presencia de burbujas o coágulos visibles.

- **Tipo de anticoagulante:** La medición de pH,  $p\text{O}_2$  y  $p\text{CO}_2$  debe efectuarse en sangre tratada con heparina (sódica o de litio) liofilizada o líquida, a una concentración de 1.000 UI/mL.

La heparina de mayor concentración (5.000 ó 10.000 UI/mL) no debería usarse ya que puede alterar el pH (dado su carácter ácido) y el calcio iónico (por su efecto quelante). El uso de jeringas con **heparina de litio tamponado con calcio liofilizado** es el procedimiento recomendado por las normas CLSI, presentando notables ventajas como: a) ahorro de tiempo, ya que no es necesario humidificar previamente el cuerpo de la jeringa con heparina líquida, b) no plantean problemas de dilución por el exceso de anticoagulante, c) minimizan el efecto quelante en la medición del Ca iónico y d) disminuyen la formación de coágulos y microfibrillas.

- **Proporción de anticoagulante:** La dosis de heparina utilizada deberá prevenir la coagulación y evitar efectos de dilución, por ello cuando se usa heparina líquida se recomienda una dosis de 40  $\mu\text{L}$  de heparina (1.000 UI/mL) por cada mililitro de sangre (alcanzando una concentración final de 40 UI/mL). Para ello, se lava la jeringa con un chorro de heparina sódica o de litio y se vacía luego, lo que deja aproximadamente un volumen residual de 0,1 mL en una jeringa estándar de 2 mL. Esto permite la anticoagulación adecuada de una muestra de 2 a 4 mL de sangre y asegura que el anticoagulante no sea añadido en exceso, pudiendo alterar el resultado.

- **Almacenamiento y transporte:** Las muestras deben analizarse lo antes posible, ya que la sangre consume  $\text{O}_2$  y libera  $\text{CO}_2$  a una velocidad que depende de la temperatura y la concentración de leucocitos. La glicólisis, principalmente en los eritrocitos, ocasiona la formación de lactato y cambios en el pH, bicarbonato y exceso de base hacia el intervalo de la acidosis metabólica. Si se almacena una muestra más de 10 minutos, deberá enfriarse entre  $0^\circ\text{C}$  y  $4^\circ\text{C}$  y no más de 30 minutos para minimizar los efectos del metabolismo.

### Tipo de muestra

- 1) **Sangre arterial:** La sangre arterial resulta el espécimen preferido para el estudio de los gases sanguíneos y equilibrio ácido-base. Las arterias son conductos donde no se

produce intercambio gaseoso y por lo tanto una muestra arterial tiene el mismo pH,  $p\text{CO}_2$  y  $p\text{O}_2$  que la sangre del ventrículo del que procede. La extracción puede realizarse por punción directa de la arteria o a partir de un catéter. Se prefiere la extracción de la arteria radial, asegurando previamente la existencia de un correcto flujo colateral por la arteria cubital mediante la maniobra de Allen modificada. Otros lugares de punción son la arteria humeral, pedia y femoral.

**Maniobra de Allen modificada:** Consiste en cerrar el puño con fuerza para desalojar la mano de sangre, a continuación se aplica una presión en la muñeca para obstruir la arteria radial y cubital, después se elimina la obstrucción de la arteria cubital mientras la radial sigue obstruida. El enrojecimiento de la palma, dedos y el pulgar en unos 10 segundos indica que la arteria cubital es capaz de irrigar toda la mano mientras la radial está obstruida. Si por el contrario el enrojecimiento se demora de 10 a 15 segundos, el resultado de la prueba no es concluyente.

- 2) **Sangre venosa:** Las muestras de sangre venosa pueden emplearse para valorar el estado del EAB del paciente, pero no son válidas para conocer el estado de oxigenación del mismo. En algunos casos se utilizan, de forma adicional a la muestra arterial, muestras venosas mixtas extraídas a partir de un catéter de Swan-Ganz (arteria pulmonar) para evaluar la  $p\text{O}_2$ , saturación de  $\text{O}_2$ , la diferencia arterio-venosa de la concentración de  $\text{O}_2$  en sangre venosa mixta, la función pulmonar (*shunt*) y el consumo de  $\text{O}_2$ .
- 3) **Sangre capilar arterializada:** La sangre capilar, cuidadosamente recogida, puede manejarse de manera muy semejante a la sangre arterial. Se emplea cuando la punción arterial es muy difícil o está contraindicada (recién nacidos, personas obesas, quemados, pacientes en síncope, etc). La muestra deberá ser sangre capilar "arterializada", para ello debe lograrse una vasodilatación local por masaje y calentamiento del lecho capilar con agua a una temperatura de  $42\text{ }^\circ\text{C}$  durante 10 a 15 minutos. La primera gota se debe eliminar, pues es rica en fluido extracelular y puede ser una causa de mediciones erróneas al alterar la concentración de ciertos electrolitos como el  $\text{K}^+$  o producir interferencias por dilución. Luego se debe dejar fluir la sangre en un capilar heparinizado sin presionar, pues de hacerlo se produce un vertido de productos a partir del componente intra- y extracelular que pueden alterar el valor de diversas magnitudes.

## EVALUACIÓN DEL EQUILIBRIO ÁCIDO-BASE

### Cómo nos damos cuenta sí...

- 1- ¿El paciente tiene acidemia, alcalemia o el pH es normal?
- 2- ¿Es un trastorno metabólico o respiratorio? Si la alteración es respiratoria, se trata de un trastorno agudo o crónico?
- 3- Es metabólico, ¿cómo se encuentra el Anión Gap? ¿La concentración de Cl<sup>-</sup> es la esperada? ¿Cómo se encuentra la albúmina?
- 4- ¿Es adecuada la compensación? En caso de que no lo sea, ¿qué trastorno mixto existe?

### 1- CÁLCULO DEL pH

#### Ecuación de Henderson-Hasselbalch (HH)

Se debe tener presente que el pH está determinado por la proporción de CO<sub>3</sub>H<sup>-</sup> y pCO<sub>2</sub>, y no por la cantidad absoluta de cada uno de ellos. La ecuación de HH dice que el pH es igual a 6,1 más el logaritmo de base 10 del cociente entre el bicarbonato y el ácido carbónico, donde la concentración de ácido carbónico es sustituida por la presión parcial de dióxido de carbono (multiplicado por el coeficiente de solubilidad para el CO<sub>2</sub> en el plasma). La ecuación de HH está incorporada en el software de todos los analizadores de gases; a partir de pH, pCO<sub>2</sub> y las constantes, calcula la concentración de CO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>.

$$\text{pH} = 6.10 + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{0.0301 \times \text{pCO}_2}$$

Una forma más práctica de aplicar la ecuación de HH es mediante una de sus variantes, la denominada ecuación de **Kassirer-Bleich**, en la cual se elimina el logaritmo y se trabaja directamente con la [H<sup>+</sup>], permitiendo describir en forma sencilla los cuatro disturbios simples del EAB. La [H<sup>+</sup>] media en el organismo es de 40 mmol/L (VR: 36 a 44 mmol/L), equivalente al pH de 7,40.

↑pCO<sub>2</sub>: ↑ [H<sup>+</sup>]: Acidosis Respiratoria  
 ↓pCO<sub>2</sub>: ↓ [H<sup>+</sup>]: Alcalosis Respiratoria  
 ↓HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>: ↑ [H<sup>+</sup>]: Acidosis Metabólica  
 ↑HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>: ↓ [H<sup>+</sup>]: Alcalosis Metabólica

$$[\text{H}^+] = 24 \times \frac{\text{pCO}_2}{[\text{HCO}_3^-]}$$

**2- Identificar cuál es la variable dependiente y cuál la que realiza el ajuste**

Aplicar las **Reglas de predicción** para cuantificar la magnitud de la respuesta compensatoria. Cuando la respuesta observada es igual a la esperada se está frente a una patología simple, pero si aquella difiere de la esperada se sospecha de una patología mixta.

- Alteraciones respiratorias: Se compara el  $\text{CO}_3\text{H}^-$  real del paciente con el esperado (obtenido en forma teórica).

$$[\text{CO}_3\text{H}^-]_{\text{(esperado)}} = 24 + \text{índice} \times (\text{pCO}_2 \text{ real} - 40)$$

Alteración	Índice	Ajuste
-Acidosis Respiratoria Aguda	0,10	$\text{CO}_3\text{H}^-$ no > 31-33
-Acidosis Respiratoria Crónica	0,35	$\text{CO}_3\text{H}^-$ no > 40-42
-Alcalosis Respiratoria Aguda	0,20	$\text{CO}_3\text{H}^-$ no < 18-20
-Alcalosis Respiratoria Crónica	0,50	$\text{CO}_3\text{H}^-$ no < 12-15

- Alteraciones metabólicas: Se compara la  $\text{pCO}_2$  real del paciente con la  $\text{pCO}_2$  esperada teóricamente.

Alteración
- Acidosis Metabólica $\text{pCO}_2$ (esperada) = $1,5 [\text{CO}_3\text{H}^-] + 8$
- Alcalosis Metabólica $\text{pCO}_2$ (esperada) = $\text{CO}_3\text{H}^- + 15$

En los disturbios metabólicos, los segundos dígitos del pH coinciden con la  $\text{pCO}_2$ .

**3- Calcular la Brecha Aniónica (BA) plasmática (Hiato aniónico o Anión Gap)** para tipificar las acidosis metabólicas. La BA plasmática es el resultado de la diferencia matemática entre el catión mayor del plasma, el  $\text{Na}^+$ , y los aniones mayores que lo acompañan en el líquido extracelular,  $\text{Cl}^-$  y bicarbonato. El hecho de que variaciones significativas en la concentración de  $\text{K}^+$  sean incompatibles con la vida, sumado a que su concentración es menor respecto a la de  $\text{Na}^+$  y los aniones que se miden habitualmente, hace que, en la práctica, el cálculo de la BA no incluya al  $\text{K}^+$ . VR:  $12 \pm 2$  mEq/L (Figura 4).

$$\text{Anión Gap} = \text{Na}^+ - (\text{Cl}^- + \text{CO}_3\text{H}^-)$$

La BA debe corregirse por la concentración de albúmina plasmática para no subestimar la magnitud de su aumento en la acidosis metabólica. Un anión Gap aumentado indica acidosis metabólica por ácidos fijos mientras que si el anión Gap está normal o levemente disminuido la acidosis metabólica es hiperclorémica. Es importante determinar el Anión Gap ya que se ha observado que los aniones no medidos son predictores de mortalidad en pacientes críticos.

$$\text{Anión Gap}_{(c)} = \text{Anión Gap}_{(p)} + 0,25 (\text{Alb}_{(N)} - \text{Alb}_{(p)})$$

Los valores de referencia para el Anión Gap fueron aceptados durante muchos años, pero se han cuestionado últimamente con la utilización de electrodos para la determinación del  $\text{Cl}^-$ , que sobrestiman el valor del mismo. Por este motivo, es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios VR.

En las acidosis metabólicas es importante **calcular el  $\text{Cl}^-$  esperado para el nivel de  $\text{Na}^+$  del paciente**. La pérdida de  $\text{CO}_3\text{H}^-$  asociada a diarreas o tubulopatías eleva concomitantemente los niveles de  $\text{Cl}^-$  para mantener la electroneutralidad.

$$\text{Cl}^-_{(\text{esperado})} = 0,75 \times [\text{Na}^+]$$

La BA puede expresarse también como la diferencia entre los aniones ( $\text{A}^-$ ) y cationes ( $\text{C}^+$ ) no medidos del plasma. El aumento en los  $\text{A}^-$  no medidos de ácidos orgánicos e inorgánicos endógenos, como así también los  $\text{A}^-$  de drogas y tóxicos exógenos, son la causa más frecuente de aumento de la BA. Por otra parte, el aumento en los  $\text{C}^+$  no medidos (hipercalcemia, hipercalemia, aumento de paraproteínas de tipo IgG, que a pH normal actúan como cationes) genera disminución de la BA. La equivalencia aniónica de la albúmina y de las proteínas también es función del pH. La acidemia disminuye la equivalencia aniónica: por cada 0,1 de descenso del pH la BA desciende 1 mEq/L, generado por titulación de las cargas aniónicas libres.

Si bien el aumento de la BA es un dato de utilidad en el diagnóstico diferencial de las AM, cabe destacar que la BA puede estar aumentada en la alcalosis metabólica por diversos mecanismos: a) la alcalemia es por sí misma una causa de aumento de la producción de ácidos orgánicos, b) la alcalemia aumenta la equivalencia aniónica de las proteínas por elevación de las cargas negativas de la albúmina y por la hiperproteinemia secundaria a la depleción de volumen que frecuentemente acompaña a las alcalosis metabólicas, c) administración de aniones orgánicos de sales no metabolizables (altas dosis de penicilina) en pacientes con depleción de volumen pueden causar alcalemia y aumento de la BA.

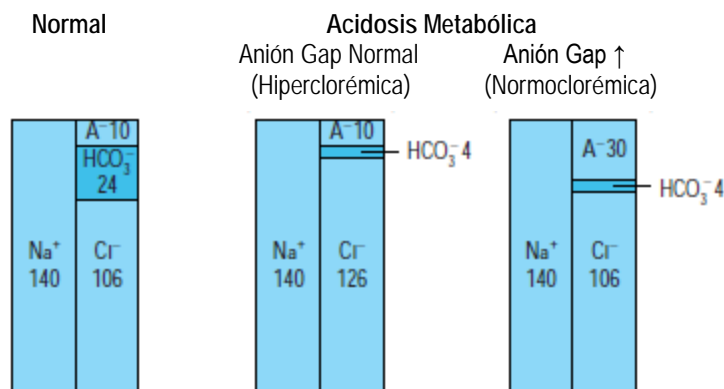


Figura 4: Interpretación gráfica del anión Gap ([www.rccc.eu/calculadoras/AGAP.html](http://www.rccc.eu/calculadoras/AGAP.html))

El anión gap urinario (AG<sub>u</sub>) puede ser medido en orina de 24 h, según la siguiente fórmula:

$$\text{Anión Gap}_u = \text{Na}^+ + \text{K}^+ - \text{Cl}^-$$

La brecha aniónica (BA) urinaria tiene por lo general un valor positivo o está cercana a cero. Cuando hay una pérdida extrarrenal de bicarbonato, el riñón potencia al máximo los mecanismos de acidificación urinaria distal, aumentando la eliminación de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en forma de ClNH<sub>4</sub>. Es decir, incrementa la eliminación de Cl<sup>-</sup> por la orina y el AG<sub>u</sub> se hace negativo hasta alcanzar valores de -40. Por el contrario, si la pérdida de bicarbonato es renal, no aumenta la eliminación de Cl<sup>-</sup> urinario y el AG<sub>u</sub> permanece positivo. Es decir, un AG<sub>u</sub> negativo, en presencia de acidosis metabólica hiperclorémica con anión gap plasmático normal, sugiere la pérdida de bicarbonato por vía digestiva (fístula pancreática, diarrea), mientras que un AG<sub>u</sub> positivo sugiere una pérdida renal de bicarbonato (acidosis tubular de los tipos I, II y IV). En estos casos, excepto en la acidosis de tipo IV, suele haber hipopotasemia.

Existen dos condiciones en donde el AG<sub>u</sub> no puede utilizarse: a) En la AM con AGap elevado, donde la excreción de aniones no medidos en la orina contrarresta el efecto del NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y b) En la deplección de volumen con retención de Na<sup>+</sup>.

**Exceso de Base (EB):** Se define como la cantidad de ácido o base, en mEq/L, necesaria para llevar 1L de sangre a pH= 7,4 (37 °C, pCO<sub>2</sub>: 40 mmHg). El EB representa una medida del nivel de ácidos metabólicos (ácidos fijos); cuando faltan bases (exceso de ácidos fijos) su valor es negativo, mientras que cuando sobran bases es positivo. Cuando la pérdida o ganancia de bases se debe a ácidos volátiles, el **EB** no se modifica. VR: ± 2 mEq/L.



Si bien la ecuación de HH es efectiva para el diagnóstico de los trastornos simples, posee ciertas carencias para cuantificar al componente metabólico ni para el estudio de los disturbios mixtos. Cuando no hay correlación en el comportamiento de los componentes y/o cuando con parámetros anormales se observa un pH dentro de lo normal, se debe sospechar de un trastorno mixto del EAB.

## **DISTURBIOS MIXTOS**

Los trastornos acido-básicos mixtos, definidos como trastornos independientes coexistentes y no como respuestas meramente compensadoras, se observan a menudo en los pacientes de las unidades de cuidados intensivos y pueden dar origen a cifras extremas y peligrosas de pH.

### **1. Trastornos dobles en la misma dirección**

- Acidosis respiratoria + Acidosis metabólica (Ej: Cetoacidosis diabética + alteración respiratoria).

- Alcalosis respiratoria + Alcalosis metabólica (Ej: hepatopatías + diuréticos).

Estas situaciones son las que dan el pH más alterado.

### **2. Trastornos que se contrarrestan: Acidosis + Alcalosis**

- Acidosis metabólica + Alcalosis metabólica (Ej: uremia y vómitos)

- Alcalosis respiratoria + Acidosis metabólica (Ej: acidosis láctica, sepsis)

En estos casos, el pH puede estar elevado, disminuido o normal.

### **3. Alteraciones triples: 3 trastornos primarios simultáneos**

(Ej: Acidosis metabólica debida a cetoacidosis alcohólica asociada a alcalosis metabólica secundaria a vómitos y alcalosis respiratoria añadida, por la hiperventilación provocada por la disfunción hepática o por la abstinencia al alcohol).

## **PARÁMETROS URINARIOS**

• El pH urinario: refleja el grado de acidificación de la orina en ausencia de problemas infecciosos. En esencia, contribuye al diagnóstico etiológico de determinadas AM y es un parámetro que permite vigilar la respuesta al tratamiento en AlcM cloruro sensible.

• Electrolitos urinarios: la determinación urinaria de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  es útil en el estudio de la respuesta renal a una alteración del EAB y orienta en relación al origen del trastorno.

Se debe tener prudencia a la hora de interpretar los resultados, sobre todo en caso de tratamiento previo con diuréticos o aportes de agua y  $\text{Na}^+$ . En todo caso, es necesario realizarlas antes de instaurar un tratamiento que pueda modificar sus resultados.

### Nomogramas

El nomograma es un gráfico en donde se representa el pH y la  $[\text{H}^+]$  (nmol/L) en el eje de abscisas, en las ordenadas se ubica la concentración plasmática de  $\text{HCO}_3^-$  en mEq/L y mediante líneas diagonales la  $\text{pCO}_2$  (mmHg). El área de normalidad representa la convergencia de valores de  $\text{pCO}_2$  y  $\text{HCO}_3^-$  para mantener el pH entre 7,38 y 7,44.

Las zonas sombreadas del nomograma muestran los límites del intervalo de confianza del 95% para la compensación normal en las alteraciones simples del EAB. Valores de  $\text{pCO}_2$  y de  $\text{HCO}_3^-$  que se salen de las bandas consignadas, representan alteraciones o trastornos mixtos. Sin embargo, valores que caen dentro del rango de normalidad no descartan trastornos ácido-base antagónicos entre sí. Por ejemplo, un paciente con un  $\text{HCO}_3^-$  de 24 mEq/L,  $\text{pCO}_2$  de 40 mmHg y un pH normal, puede tener acidosis metabólica más alcalosis metabólica (vómitos más diarrea).

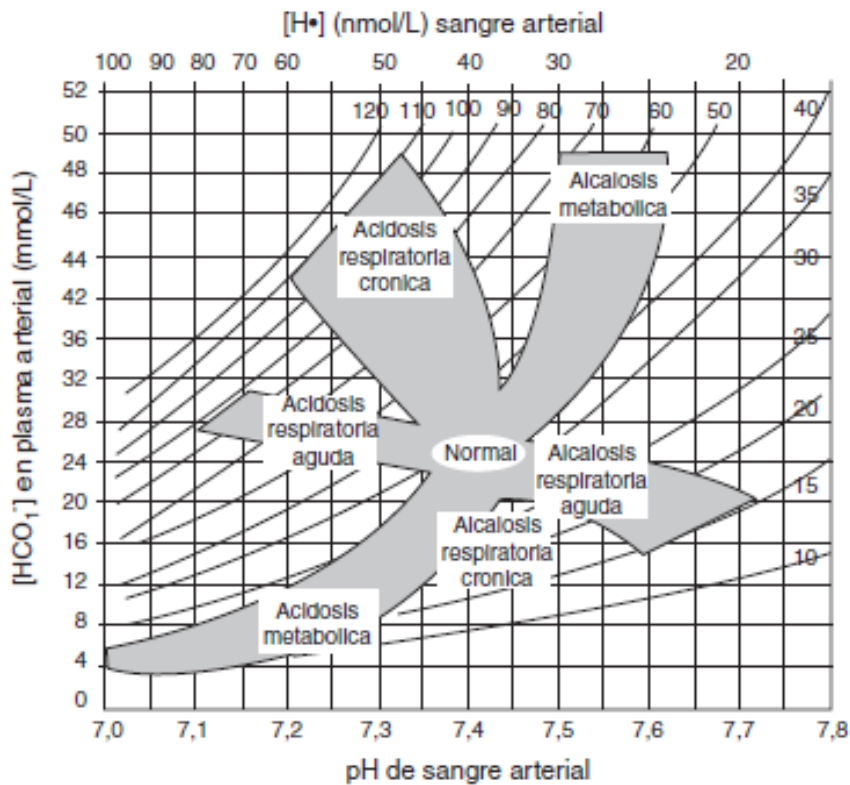


Figura 8: Nomograma ácido-básico: señalan los límites de confianza del 95% de las compensaciones respiratorias y metabólicas normales en trastornos ácido-base primarios (Dial Traspl 2012:33:25-34-DOI:10.1016/i.dialis.2011.06.004).

## MODELO DE STEWART

El abordaje diagnóstico y terapéutico del desequilibrio AB se realiza en base a la ecuación de HH, sin embargo este modelo no explica todas las alteraciones AB, especialmente aquellas que se presentan en pacientes críticos. Para la correcta interpretación del EAB se requiere utilizar la fisicoquímica cuantitativa (**Modelo de Stewart**).

Según este enfoque, las variaciones del pH plasmático dependen del grado de disociación del agua plasmática, que a su vez obedece a la relación simultánea de tres principios fisicoquímicos fundamentales: el principio de la electroneutralidad, la conservación de masas y el equilibrio de disociación electroquímica. Teniendo en cuenta estos conceptos, el pH dependerá de tres variables independientes: (a) la diferencia de iones fuertes (DIF), (b) ácidos débiles no volátiles (Atot) y (c)  $p\text{CO}_2$ . El mérito de esta aproximación es fusionar el estado ácido-base con los cambios en los electrolitos en una misma interpretación. En este modelo la DIF es regulada por el riñón, la concentración Atot lo es por el hígado y la  $p\text{CO}_2$  por el pulmón.

En el plasma normal el DIF es igual a 42 mEq/L. Esto significa que para lograr la electroneutralidad se requieren 42 mEq de iones de carga negativa diferente de los iones fuertes. La DIF está compuesta principalmente por  $\text{HCO}_3^-$  y los Atot forman parte de la albúmina y el fosfato. El efecto que tiene el DIF sobre el pH es directo, es decir, al aumentar el DIF aumenta el pH y por lo tanto disminuye el componente ácido. El efecto que tienen los Atot sobre el pH es inverso, es decir aumentan los Atot y se reduce el pH.

### Clasificación de las alteraciones ácido-base usando el Método de Stewart

La división de las alteraciones ácido-base se basa en los cambios de las variables independientes. La alcalosis o acidosis respiratoria son aquellas cuya variable afectada es la  $p\text{CO}_2$ . La respuesta compensadora se debe a cambios en la DIF plasmática. La acidosis metabólica puede ser considerada como un aumento en las condiciones que causan reducción de la DIF o incremento de Atot. A la inversa, la alcalosis metabólica se define como un proceso en donde DIF plasmático aumenta o los Atot disminuyen (Figura 9).

EN RESUMEN: Mientras que el enfoque tradicional del EAB del plasma se basa en la distribución de las sustancias aceptoras de protones (sobre todo  $\text{HCO}_3^-$ ), el modelo de Stewart se fundamenta en la distribución de las cargas eléctricas, teniendo en cuenta todos los cationes y aniones fuertes y débiles.

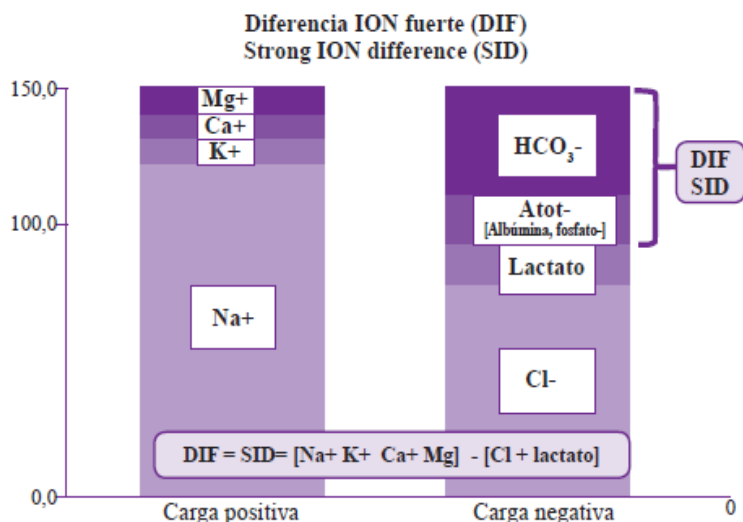


Figura 9: Diferencia Ion Fuerte (DIF, SID) según el Modelo de Steward (<https://doi.org/10.1016/j.rca.2015.04.001>).

### SISTEMAS MULTIPARAMÉTRICOS

En general, la determinación del EAB y del estado de oxigenación del paciente son análisis solicitados con carácter urgente y a partir de los cuales se decide la aplicación de una terapéutica inmediata, hecho que implica especial cuidado en relación a la fiabilidad de los resultados. Éstos no sólo dependen de las características del instrumento utilizado, sino también de una toma de muestra adecuada y del uso controles de calidad internos y externos. De esta manera es posible garantizar un buen funcionamiento de equipo, es decir que se mantenga dentro de los límites permitidos por los requerimientos de calidad establecidos previamente por el laboratorio. Se recomienda el empleo de **autoanalizadores multiparamétricos**, ya que permiten el análisis integrado de gases en sangre, oximetría, electrolitos y metabolitos. Entre sus distintas ventajas, cabe señalar:

- Estabilidad y rapidez
- Durabilidad de las membranas de los electrodos
- Calibración precisa y rápida
- Alto rendimiento con mínimo volumen de muestra
- Poderosos software para el cálculo de parámetros derivados
- Algoritmos internos para estimación diagnóstica

En varios de estos equipos, el pH, la pCO<sub>2</sub> y los iones (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> y Ca<sup>++</sup>) son medidos por potenciometría; la pO<sub>2</sub>, glucosa y lactato por amperometría; el hematocrito por conductimetría y la bilirrubina, Sat.O<sub>2</sub> y Hb y sus fracciones, por espectrofotometría.

## ACTIVIDAD PRÁCTICA

### Resolución de Casos Clínicos

Es importante recordar que en la práctica clínica los datos de laboratorio no deben ser interpretados de forma aislada, sino en el contexto clínico del paciente (SEQC, 2014).

#### Caso 1

La muestra 1 (sangre arterial proveniente de quirófano), tomada con heparina sódica (25.000 UI/5ml) como anticoagulante, no pudo validarse debido a la falta de lectura del  $\text{Ca}^{+2}$  iónico. Por esta razón, se tomó una segunda muestra, empleando esta vez una jeringa cargada con heparina de Li liofilizado tamponado con calcio (80 UI/3mL). Los datos obtenidos en esta ocasión fueron validados e informados al médico tratante.

1- Interpretar los resultados y explique la disparidad observada entre ellos.

	Muestra 1	Muestra 2
pH	7,44	7,46
pCO <sub>2</sub>	13,4	25,7
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	9	18
EB	+15	-5,6
Hb	7.6	13
Na <sup>+</sup>	156	135

#### Caso 2

Hombre de 45 años, 70 Kg de peso, ingresa por un cuadro de diarrea de 3 semanas de evolución. Al examen físico se encuentra con deshidratación extracelular e hipotensión ortostática. Los exámenes de laboratorio revelan los siguientes resultados:

pH: 7,32; pCO<sub>2</sub>: 28 mm Hg; HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>: 14 mEq/L; BE: - 12 mEq/L

Na<sup>+</sup>: 140 mEq/L; K<sup>+</sup>: 2,2 mEq/L; Cl<sup>-</sup>: 115 mEq/L; pH urinario: 5,1; NH<sub>4</sub><sup>+</sup> urinario: aumentado.

1- ¿Cuál es el trastorno ácido-base? JSR

- a) alcalosis respiratoria con compensación renal incompleta
- b) acidosis metabólica con anión gap normal
- c) acidosis metabólica con anión gap aumentado
- d) acidosis respiratoria con sobrecompensación renal
- e) acidosis mixta

**Caso 3**

Paciente de 50 años (60 kg) es encontrado en vía pública con compromiso de conciencia. Al ingreso se objetiva en coma, respiración profunda (frecuencia 35/min). El volumen del LEC se halla levemente disminuido y se percibe un cierto aliento a acetona.

pH: 7,05; pCO<sub>2</sub>: 18 mmHg; BE: - 24 mEq/L; HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>: 6,1 mEq/L. Hematocrito: 38 %; Hb: 16 g/dL (VR: 13); Glucemia: 90 mg/dL (VR: 70-110); Cetonemia: positiva; Creatininemia 1,0 mg/dL (VR: 0,8-1,4); Nitrógeno ureico: 12 mg%. Na<sup>+</sup>: 140 y K<sup>+</sup>: 7 mEq/L y Cl<sup>-</sup>: 85 mEq/L.

1- ¿Cuál es el trastorno ácido-base? JSR

- a) alcalosis respiratoria con compensación renal incompleta
- b) acidosis metabólica con anión gap normal
- c) acidosis metabólica con anión gap aumentado
- d) acidosis respiratoria con sobrecompensación renal
- e) acidosis mixta

**Caso 4**

Con qué patología es más probable que se correspondan los siguientes exámenes de laboratorio: 1) diarrea crónica 2) intoxicación por metanol 3) EPOC 4) vómitos e IR.

1- Colocar el número correspondiente a cada fila (1, 2, 3, 4).

Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	pH	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	pCO <sub>2</sub>
140	4,1	96	7,4	24	40
140	4,1	100	7,2	9	25
140	3,7	110	7,33	16	31
140	4	90	7,34	33	60

**Caso 5**

Mujer de 75 años. Clasifique los siguientes parámetros obtenidos del informe de gasometría. Señale si se encuentran aumentados (↑), disminuidos (↓) o sin cambios (=).

1- Analice los resultados y justifique su respuesta.

- |   |   |
|---|---|
| PaO <sub>2</sub> (80-100 mmHg)= 53,1<br>FIO <sub>2</sub> = 0,21 (aire ambiente)<br>PA-aO <sub>2</sub> (10-15 mmHg)= 31,9<br>PaCO <sub>2</sub> (35-45 mmHg)= 65<br>ctO <sub>2</sub> (a) (18,8-22,3 mL/dL v / 15,8-19,9 mL/dL m)= 12<br>ctHb (13-17 g/dL v / 12-16 g/dL m)= 13,1<br>HTO (42-52% v / 37-47% m)= 39 | SaO <sub>2</sub> (92,0-98,5%)= 86,5<br>FO <sub>2</sub> Hb (94-98%)= 86,3<br>FHHb (<5%)= 13,1<br>FCOHb (<1%)= 0,3<br>FMetHb (<1,5%)= 0,3<br>p50 (24-28 mmHg)= 26,2<br>Lactato (0,5-2,0 mmol/L)= 2,41 |
|---|---|

	Captación de O <sub>2</sub> :
	Transporte de O <sub>2</sub> :
	Liberación adecuada de O <sub>2</sub> :
	Oxigenación tisular:

**Caso 6**

Mujer de 30 años. Clasifique los parámetros obtenidos del informe de gasometría.

1- Señale si se encuentran aumentados (↑), disminuidos (↓) o sin cambios (=). Analice los resultados y justifique su respuesta.

PaO <sub>2</sub> (80-100 mmHg)= 92	SaO <sub>2</sub> (92,0-98,5%)= 97
FIO <sub>2</sub> = 0,21 (aire ambiente)	FO <sub>2</sub> Hb (94-98%)= 65
PA-aO <sub>2</sub> (10-15 mmHg)= 14	FHHb (<5%)= 4,5
PaCO <sub>2</sub> (35-45 mmHg)= 44	FCOHb (<1%)= 30
ctO <sub>2</sub> (a) (18,8-22,3 mL/dL v / 15,8-19,9 mL/dL m)= 17	FMetHb (<1,5%)= 0,5
ctHb (13-17 g/dL v / 12-16 g/dL m)= 14	p50 (24-28 mmHg)= 20
HTO (42-52% v / 37-47% m)= 41,2	Lactato (0,5-2,0 mmol/L)= 2,9

	Captación de O <sub>2</sub> :
	Transporte de O <sub>2</sub> :
	Liberación adecuada de O <sub>2</sub> :
	Oxigenación tisular:

**Caso 7**

Mujer de 20 años. En el mismo momento se extraen dos muestras del paciente para gasometría arterial. Señale si los siguientes parámetros obtenidos del informe de gasometría se encuentran aumentados (↑), disminuidos (↓) o sin cambios (=). Proponga una causa que explique estos resultados.

PaO <sub>2</sub> (80-100 mmHg)= 84	PaO <sub>2</sub> (80-100 mmHg)= 90
FIO <sub>2</sub> = 0,21 (aire ambiente)	FIO <sub>2</sub> = 0,21 (aire ambiente)
PA-aO <sub>2</sub> (10-15 mmHg)= 15	PA-aO <sub>2</sub> (10-15 mmHg)= 10
PaCO <sub>2</sub> (35-45 mmHg)= 51	PaCO <sub>2</sub> (35-45 mmHg)= 50
ctO <sub>2</sub> (a) (18,8-22,3 mL/dL v / 15,8-19,9 mL/dL m)= 16	ctO <sub>2</sub> (a) (18,8-22,3 mL/dL v / 15,8-19,9 mL/dL m)= 16,2
ctHb (13-17 g/dL v / 12-16 g/dL m)= 10	ctHb (13-17 g/dL v / 12-16 g/dL m)= 10
HTO (42-52% v / 37-47% m)= 29,4	HTO (42-52% v / 37-47% m)= 29,4
SaO <sub>2</sub> (92,0-98,5%)= 95,5	SaO <sub>2</sub> (92,0-98,5%)= 96
FO <sub>2</sub> Hb (94-98%)= 95	FO <sub>2</sub> Hb (94-98%)= 96,5
FHHb (<5%)= 4,7	FHHb (<5%)= 3,2
FCOHb (<1%)= 0,2	FCOHb (<1%)= 0,2
FMetHb (<1,5%)= 0,1	FMetHb (<1,5%)= 0,1
p50 (24-28 mmHg)= 26	p50 (24-28 mmHg)= 25
Lactato (0,5-2,0 mmol/L)= 1,7	Lactato (0,5-2,0 mmol/L)= 2,2
Glucosa (70-105 mg/dL)= 77	Glucosa (70-105 mg/dL)= 65

1- En los últimos tres casos presentados de gasometría arterial, analice:

- Diagnóstico más probable en cada uno de los casos.
- Demora en el procesamiento de la muestra (Caso.....)
- Carboxihemoglobinemia por intoxicación con humo (Caso.....)
- Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Caso.....)

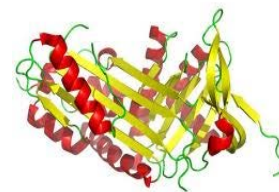
## BIBLIOGRAFÍA

- MEDICINA DE LABORATORIO. FUNDAMENTOS Y APLICACIONES EN EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO. I Antonozzi y E Gulletta. 1ª Edición. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires 2015.
- CURSO MEDIO INTERNO: GASES, ELECTROLITOS Y METABOLITOS. S González. Asociación. Bioquímica Argentina (ABA), Buenos Aires 2012.
- HARRISON PRINCIPIOS DE MEDICINA INTERNA. DL Longo, AS Fauci, DL Kasper, SL Hauser, JL Jameson, J Loscolzo J. 18ª Edición. Ed. Mc. Graw Hill, España 2012.
- EL LABORATORIO EN EL DIAGNOSTICO CLINICO. JB HENRY. 20ª Edición. Ed. Marbán, España 2010.
- FISIOPATOLOGÍA. SALUD-ENFERMEDAD: UN ENFOQUE CONCEPTUAL. CM Porth. 7ª Edición. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires 2006.
- INTERPRETACIÓN CLÍNICA DEL LABORATORIO. G Angel y M Angel. 7ª Edición. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires 2006.
- ESTUDIO DE LA OXIGENACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LA GASOMETRÍA ARTERIAL. P Oliver, O Rodríguez, JL Marín, M Muñoz, E Guillén, G Valcárcel, A Galán, F Rodríguez Cantalejo. Documentos de la SEQC - España 2015.



## TRABAJO PRÁCTICO N° 6

### ESTUDIO DE PROTEÍNAS EN EL LABORATORIO CLÍNICO



#### OBJETIVOS

- Conocer los métodos para la cuantificación de proteínas más utilizados en la práctica clínica.
- Separar proteínas del suero por electroforesis en acetato de celulosa.
- Identificar las enfermedades asociadas con alteraciones de proteínas específicas a los perfiles electroforéticos respectivos.
- Aplicar los conocimientos adquiridos en la interpretación de casos clínicos.

#### INTRODUCCIÓN

Las proteínas (polipéptidos) son compuestos orgánicos ampliamente distribuidos en el organismo. Están formadas por una cadena continua de átomos de carbono y nitrógeno enlazados entre sí a través de enlaces peptídicos entre aminoácidos adyacentes.

Las proteínas están presentes en todas las células y en los distintos líquidos corporales: suero o plasma (66-83 g/L), orina (100-200 mg/L), líquido cefalorraquídeo (15-45 mg/dL), aunque estos valores pueden variar ligeramente según el método utilizado.

Las proteínas participan en gran variedad de funciones del organismo, entre las que se encuentran la respuesta inmunológica (respuesta inflamatoria y control de la infección), el transporte de compuestos endógenos/exógenos poco solubles en agua (hormonas esteroideas, bilirrubina), la catálisis enzimática, la distribución de líquidos, el mantenimiento de la presión oncótica del plasma y la participación en procesos de coagulación.

Con excepción de los componentes del complemento y las inmunoglobulinas, casi todas las proteínas del suero se producen en el hígado. En su mayoría son catabolizadas por los macrófagos y las células del endotelio capilar y las proteínas pequeñas se pierden pasivamente en el glomérulo renal y la pared intestinal. Por ello, su determinación en suero proporciona información clínica relevante que puede ser utilizada para el diagnóstico, monitoreo, y tratamiento de enfermedades que afectan al ser humano.

Las alteraciones que se presentan cuando se estudian las proteínas plasmáticas se conocen con el nombre genérico de disproteinemias. Las causas generales que provocan cambios en la concentración total de proteínas son la variación de la composición acuosa

del plasma y las modificaciones en la concentración de las proteínas como albúmina e inmunoglobulinas. Son más frecuentes los casos de hipoproteinemia (pérdidas renales, desnutrición, infecciones prolongadas) que los de hiperproteinemia (mieloma múltiple, endocarditis bacteriana y hemoconcentración de diversos orígenes). El aumento o descenso puede afectar a una o más proteínas.

**Existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas totales:**

- *Gravimétrico*: es considerado de elección y método de referencia. Debido a su complejo desarrollo y por el carácter hidrocópico de la proteína deshidratada, impide su empleo de rutina.
- *Kjeldahl*: es un método de referencia. Determina la concentración proteica en base a nitrógeno. No es una técnica sencilla, por ello no se usa habitualmente en laboratorios clínicos.
- *Determinación por energía radiante*: La absorción de luz ultravioleta a 270-280 nm es utilizada para medir el contenido de proteínas que poseen anillos aromáticos de tirosina, fenilalanina y triptófano a pH 8. Este método no es aplicable en la determinación de proteínas totales ya que existen variaciones significativas en el contenido de esos aminoácidos en las distintas fracciones proteicas de suero.
- *Determinación por unión a colorantes*: Las proteínas más los colorantes forman complejos con propiedades ópticas útiles para su cuantificación. Es un método bueno para la determinación de albúmina, no es aconsejado para proteínas totales en suero o en plasma ya que las distintas proteínas se conjugan o reaccionan de manera diferente con los colorantes.

Los métodos más comunes para la determinación de proteínas totales son los colorimétricos, en donde un colorante, o un componente de él se unen a lugares específicos de la proteína, produciendo un cambio de color en la muestra. Para hacer cuantificable estos métodos es necesario previamente elaborar una curva de calibración.

- **Método de Lowry**: se basa en la reducción del ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico en presencia de tirosina y triptófano, generando un color azul (650 a 750 nm).

- **Método de Bradford**: es un método muy sensible basado en la unión del colorante azul brillante de Coomassie G-250 a las proteínas y se obtiene un complejo de color azul brillante (595 a 610 nm).

- **Método de Biuret**: es uno de los métodos más empleados en el laboratorio clínico.

El nombre de la reacción procede del compuesto coloreado formado por la condensación de dos moléculas de urea con eliminación de amoníaco. Esta reacción está

dada por aquellas sustancias cuyas moléculas contienen dos grupos carbamino (-CO.NH) unidos directamente o a través de un solo átomo de carbono o nitrógeno.

El reactivo de Biuret contiene  $\text{Cu}_2\text{SO}_4$  en solución acuosa alcalina (por la presencia de NaOH o KOH). La reacción se basa en la formación de un compuesto de color violeta, que se origina de un complejo de coordinación entre los iones  $\text{Cu}^{2+}$  y los pares de electrones no compartidos del nitrógeno que forma parte de los enlaces peptídicos (Figura 1). Los compuestos que tengan dos o más enlaces peptídicos consecutivos en sus moléculas (proteínas) dan positiva esta reacción.

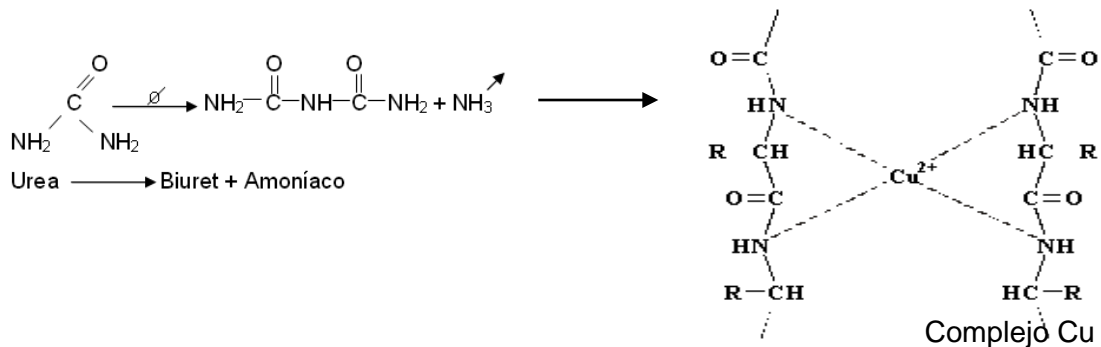


Figura 1. Reacción de Biuret

El color que resulta (violeta), es una mezcla de rojo y azul: rojo debido al enlace del cobre con la unión peptídica y azul por la unión de cobre con la amina libre de la proteína. El máximo de absorción del complejo proteína-Biuret es a 545 nm, cuando se lee frente a blanco de reactivo. Cuando el blanco es agua, el máximo de absorción se produce 580 nm. La reacción tiene la ventaja de dosar lipoproteínas y glicoproteínas. En la clínica, se obtienen resultados reproducibles cuando se compara el método de Biuret con el de Kjeldhal.

La determinación de proteínas totales representa la suma total de proteínas presentes en la muestra (Tabla 1), por lo que no es un índice sensible de elevaciones o descensos anormales de las fracciones individuales. Para ello se requieren de metodologías que informen sobre las diferentes fracciones de proteínas como:

- a) **Electroforesis de zona** (soporte: acetato de celulosa, agarosa) (Figura 1): puede ser manual, o automatizada. La evaluación del trazado electroforético implica una inspección visual del gel y la posterior valoración de las distintas fracciones por densitometría. Los colorantes más empleados son violeta ácido, azul brillante de Coomassie y negro amido. Los geles de agarosa poseen mayor sensibilidad que los de acetato de celulosa en la separación de las distintas fracciones proteicas, especialmente en las zonas beta1 y

beta2, lo que optimiza la detección de componentes monoclonales (CM) que migran en dichas zonas.

- b) **SDS – Electroforesis:** todas las fracciones poseen carga negativa uniforme; la separación se realiza en función del peso molecular.
- c) **Electroforesis capilar (EC):** se realiza en un capilar de diámetro inferior a 200µ por el que circula un buffer. En el extremo catódico del capilar se efectúa la detección directa de las proteínas a 220 nm. Es una técnica completamente automatizada.

Tanto la electroforesis en gel de agarosa, como la electroforesis capilar cumplen los objetivos analíticos de calidad en cuanto a imprecisión analítica de las distintas fracciones del proteinograma (especificación de calidad deseable: CVa < 0,5 Cvi).

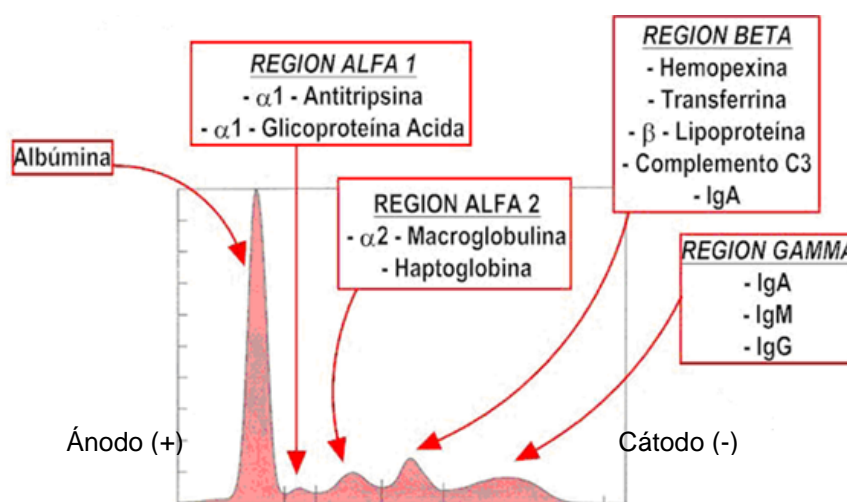


Figura 1. Perfil electroforético en suero normal (Electroforesis de zona). Modificado de Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis. David F Keren, 2003 Edward Arnold (Publishers).

En ausencia de enfermedad, el proteinograma sérico muestra un perfil electroforético caracterizado por bandas de perfil policlonal, con una relación porcentual entre las distintas fracciones proteicas que se mantienen más o menos constantes. Los valores de referencia dependerán de la edad de los pacientes. Por la complejidad de los perfiles que pueden encontrarse, es fundamental un mínimo de información clínica en la solicitud del proteinograma que ayude a su correcta interpretación. El informe de laboratorio debe aportar siempre, junto con el trazado electroforético (gráfica), la interpretación del perfil.

Hay que tener presente que el proteinograma electroforético (PE) proporciona la información correspondiente a las proteínas mayoritarias de cada banda y por tanto, los datos que parece aportar sobre una proteína específica puede estar distorsionada en presencia de concentraciones aumentadas de las otras proteínas que comparten la zona de migración. La valoración cuantitativa de las principales proteínas plasmáticas se realiza por

otros procedimientos analíticos. Los métodos para la cuantificación de proteínas específicas incluyen:

- Inmunodifusión radial
- Inmunoturbidimetría
- Inmunonefelometría
- Quimioluminiscencia

Las técnicas nefelométricas son analíticamente más precisas y sensibles, pero no hacen distinción entre el componente monoclonal y el fondo policlonal.

Tabla 1. Grupos de Proteínas ordenadas de acuerdo al grupo electroforético al que pertenecen las principales proteínas plasmáticas y sus funciones.

<b>Grupos de Proteínas</b>		
<b>Grupos</b>	<b>Proteína(s)</b>	<b>Función</b>
Albúmina	Albúmina	Principal proteína plasmática; contribuye a reducir la acumulación de agua en los tejidos; transportadora de varias sustancias.
Alfa1-globulina	Alfa1-antitripsina	Inactiva la tripsina y otros enzimas proteolíticos; reduce la lesión propia de una inflamación.
	Orosomucoide	Modulador de la respuesta inmune, une drogas ácidas como lidocaína.
	Lipoproteína de alta densidad (HDL)	Transporte reverso del colesterol.
Alfa2-globulina	Alfa2-macroglobulina	Se une a muchos enzimas y los inactiva, evitando la lesión tisular.
	Haptoglobina	Proteína de unión de la hemoglobina.
	Ceruloplasmina	Proteína de unión que contiene cobre, implicada en el metabolismo del hierro.
Beta-globulina	Transferrina	Transporte de hierro y liberación del mismo a las células.
	Lipoproteína de baja densidad (LDL)	Liberación de colesterol a los tejidos.
	Fracción 3 del Complemento	Ayuda a regular la respuesta inflamatoria a sustancias extrañas
Gamma-globulina	IgG	Principal inmunoglobulina relacionada a la inmunidad a largo plazo.
	Proteína C Reactiva	Mediador de la respuesta inflamatoria.
	IgM	Inmunoglobulina de respuesta inicial.
	IgA	Inmunoglobulina asociada a secreciones.

### **Consideraciones pre-analíticas para la realización de un proteinograma electroforético (PE)**

La muestra de elección es **suero**, ya que el fibrinógeno presente en plasma da lugar a una banda rápida en la zona gamma que puede ser confundida con un componente monoclonal, al igual que en pacientes que cursan procesos inflamatorios agudos con elevación de la proteína C reactiva. Además, las bandas de IgA pueden ocultarse por la transferrina. (Tabla 2).

Es importante que la muestra sea fresca, ya que la vida media de algunas proteínas es corta (factores del complemento, alfa1-antitripsina). Muestras envejecidas pueden perturbar la correcta interpretación del PE. Así mismo, se recomienda evitar la hemólisis y la lipemia, ya que generan artefactos que también dificultan la interpretación del PE. Los sueros con bilirrubina total inferior a 10 mg/dL son aptos para procesarse.

Tabla 2. Interpretaciones erróneas en la electroforesis. Recomendaciones para el estudio de las gammopatías monoclonales. Documentos de la SEQC 2009.

Falsos positivos (se informa de un CM que no existe)	Falsos negativos (no se informa de un CM que sí existe)
Fibrinógeno (y sus productos de degradación)	CM débil
Proteína C reactiva	CM débil superpuesto a una banda
Variantes fenotípicas de proteínas (transferrina, C3, $\alpha_1$ -antitripsina, hemoglobina)	Inmunoglobulinas monoclonales polimerizadas (banda de aspecto policlonal)
Muestras contaminadas y muestras sometidas a procesos repetidos de congelación / descongelación	Crioglobulinas
Administración endovenosa de contrastes iodados	

\* CM: componente monoclonal

\* C3: fracción C3 del complemento

### Métodos que complementan el PE

*Métodos electroforéticos seguidos de una reacción inmunoquímica con antisueros específicos:*

#### a) Inmunofijación (IF):

Las proteínas migran en la electroforesis y se inmunofijan y precipitan con antisueros de diferentes especificidades: anti-gamma, para la detección IgG; anti-alfa para IgA; anti-mu para IgM; anti-lambda ( $\lambda$ ) y anti-kappa ( $\kappa$ ) para cadenas livianas. Los antisueros empleados para la identificación de cadenas livianas  $\kappa$  y  $\lambda$  no discriminan si éstas se encuentran libres en suero o si están unidas a cadenas pesadas. Luego de la IF, las proteínas se tiñen con violeta ácido para permitir su visualización. Esta técnica se indica en los pacientes que presentan un pico en la región beta o gamma de la electroforesis de proteínas séricas con sospecha de discrasias de células plasmáticas. La aparición de una proteína monoclonal se identifica por una banda muy definida y delimitada que reacciona con un anticuerpo contra cadena pesada y con uno contra cadenas livianas; ambas bandas migran en la misma distancia (Figura 2).

b) **Isoelectroenfoque (IEF):**

Usa un gradiente de pH con sustancias anfotéricas que permite la separación de las proteínas en función de su punto isoeléctrico. Se emplea en la búsqueda de bandas oligoclonales en LCR.

La IF en suero no es lo suficientemente sensible para detectar pequeñas cantidades de cadenas livianas libres en suero (como ocurre en el mieloma de células plasmáticas secretor de cadenas livianas) y el estudio se debe complementar con IF para proteína de Bence Jones en orina y, si está disponible, con la cuantificación de cadenas livianas libres.

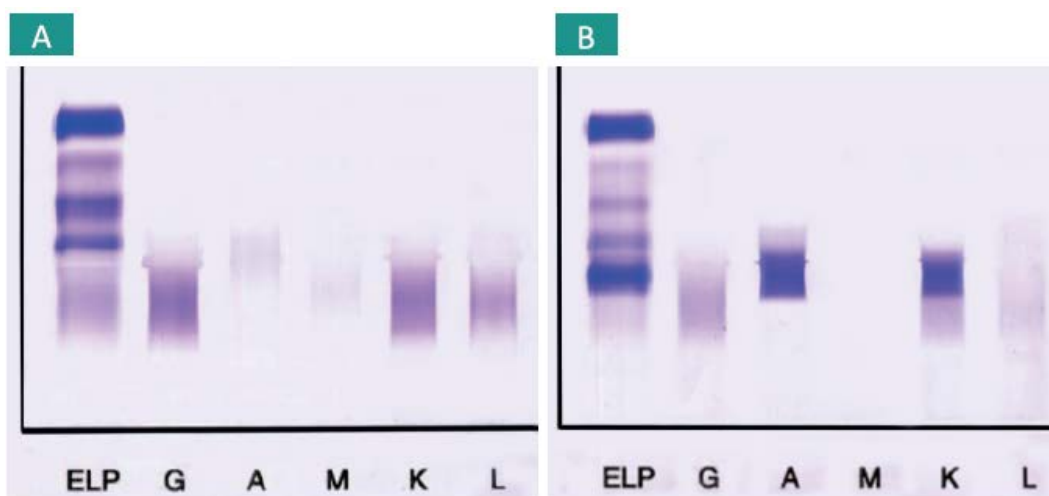


Figura 2. Inmunofijación en suero. A. Patrón normal; tinción difusa y policlonal de las inmunoglobulinas y de las cadenas livianas. No se observa componente monoclonal. B. Se aprecia componente monoclonal IgA con restricción de cadenas kappa (Medicina y Laboratorio 2013; 19:7-8).

**Cadenas livianas libres**

Las inmunoglobulinas (Igs) se componen de un par de cadenas pesadas idénticas entre sí, unidas a dos CL del tipo kappa ( $\kappa$ ) o lambda ( $\lambda$ ) también idénticas entre sí. Las cadenas pesadas y ligeras son producidas por separado, posteriormente se unen y son secretadas hacia la sangre. Para asegurar la correcta conformación de las Igs, las células plasmáticas producen un exceso de CL cuyo excedente es secretado conjuntamente con las Igs completas; el 40% de las CL se encuentran libres en el suero, no unidas a cadenas pesadas. Estas cadenas livianas libres en suero (CLLs) se presentan con diferente conformación: las  $\kappa$ CLLs como monómeros de 25 kDa, mientras las  $\lambda$ CLLs forman dímeros de 50 kDa.

Debido a su bajo peso molecular, las CLL filtran fácilmente por el glomérulo para luego ser reabsorbidas en el túbulo contorneado proximal. Teniendo en cuenta que la producción

fisiológica de CLL es de aproximadamente 0,5 g/24 h y que el riñón humano es capaz de reabsorber hasta 30 g/24 h de proteínas pequeñas, en condiciones normales la gran mayoría de estas proteínas serán metabolizadas y sólo pequeñas cantidades se encontrarán en orina. Únicamente cuando los mecanismos de reabsorción renal se vean superados por una masiva producción (proteinuria de Bence-Jones), las CLL podrán ser detectables en una muestra de orina de 24 h.

Para evaluar la proteinuria de Bence Jones se realiza un uroproteinograma, en donde se observará, en caso de estar presentes las CLL en la orina, una banda homogénea muy definida en la zona beta-gamma. Para verificar que corresponden a CLL se debe realizar la IF de la muestra de orina. Sin embargo, un exceso de CLLs puede afectar la función renal (propiedades nefrotóxicas) y no reflejar la realidad clínica del paciente. Por esta razón, en pacientes con GM y por ende aumento de las CLLs, se prefiere analizar suero en lugar de orina.

*Cuantificación de cadenas ligeras libres en suero (CLLs)*

El ensayo de CLLs (Freelite®) permite la identificación por separado de las CLLs κ y las CLLs λ mediante anticuerpos policlonales que reconocen específicamente epítomos en la región constante de las CL que están ocultos en las inmunoglobulinas intactas pero que se exponen en las CLLs (Figura 3). La reacción puede ser evidenciada por nefelometría o turbidimetría. La detección de ambas proteínas séricas permite calcular el **cociente CLLs κ / CLLs λ**, cuya alteración identifica monoclonalidad y tiene un papel crítico en el diagnóstico y pronóstico de discrasias de células B.

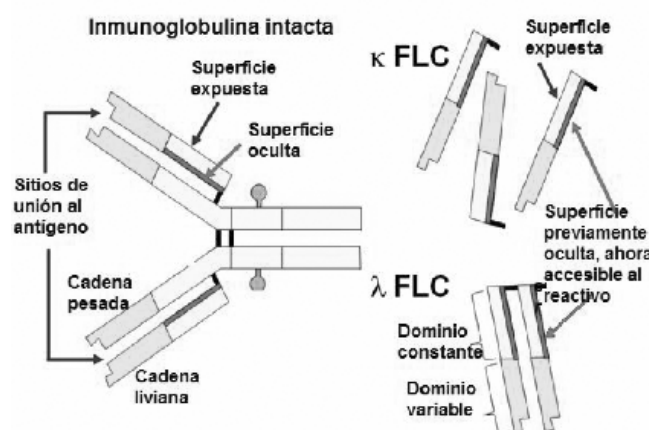


Figura 3. Diagrama de inmunoglobulina intacta, mostrando la estructura de las cadenas pesadas y las cadenas livianas junto a las formas libres de κ y λ. Los epítomos reconocidos por el reactivo están resaltados en gris oscuro (Revista Médica Uruguaya 2014; 30:65-75).



El ensayo de CLLs posee una sensibilidad superior a cualquiera de los métodos disponibles. Los valores de referencia para CLLs  $\kappa$  y CLLs  $\lambda$ : 3,3-19,4 mg/L y 5,7-26,3 mg/L, respectivamente, y para la relación  $\kappa/\lambda$ : 0,26-1,65. Los valores obtenidos deben ser interpretados teniendo en cuenta el contexto clínico del paciente y en presencia de deterioro renal se utiliza como rango de referencia de la relación  $\kappa/\lambda$ : 0,37-3,1.

## DISGAMMAGLOBULINEMIAS

Observando el PE, las alteraciones que presentan las proteínas en la zona de las globulinas pueden ser clasificadas en (Figura 4):

**1. Policlonales:** patrón multibanda, resultado de la activación de muchos clones de células plasmáticas en la respuesta humoral, secundario a cirrosis hepática o VIH en fase reactiva, infecciones crónicas, enfermedades autoinmunes, etc.

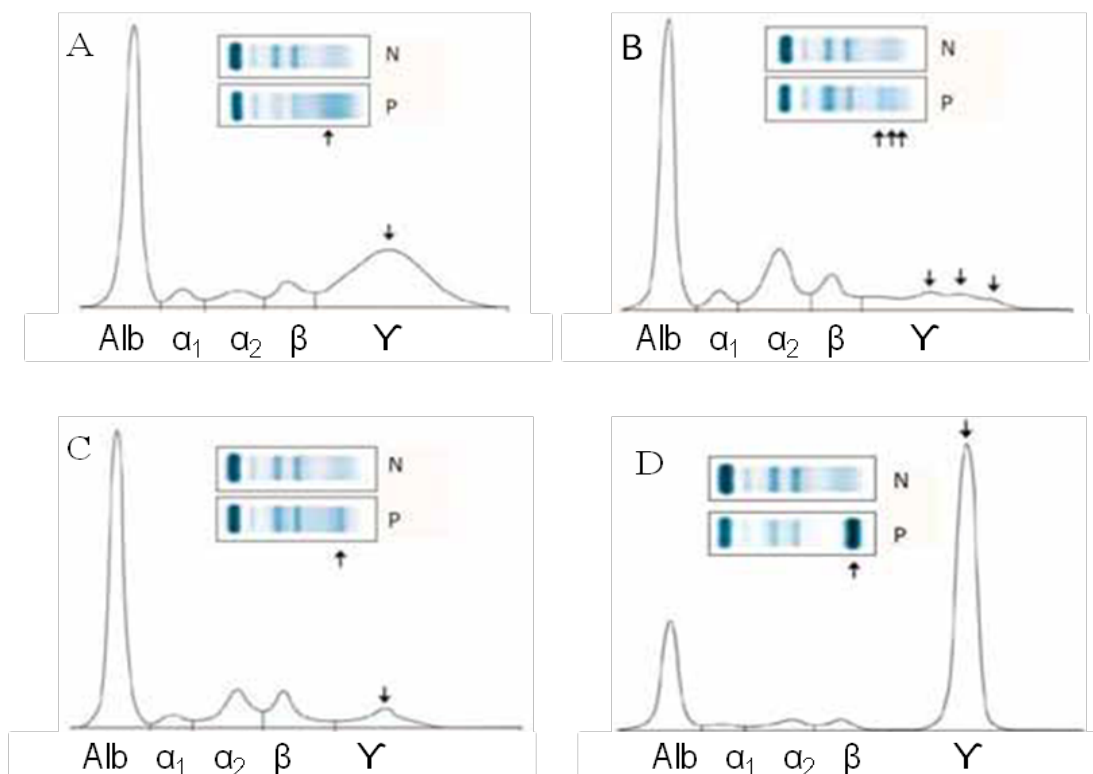


Figura 4. Proteinograma electroforético sérico en gel de agarosa. A) Hipergamaglobulinemia policlonal; B) Perfil oligoclonal; C) Banda electroforética homogénea débil y D) Banda electroforética homogénea fuerte (Journal Molecular Biology 2010; 29: 9–14).

**2. Oligoclonales:** son provocadas por una desregulación de varios clones de células plasmáticas que pueden producir una o más bandas homogéneas en el PE. Por IF, pueden reaccionar con uno o varios de los antiseros anticadenas pesadas y livianas,

manteniéndose la relación  $\kappa/\lambda$  (2:1). Los anticuerpos del perfil oligoclonal son por lo general del isotipo IgG-kappa. Se relaciona con la presencia de inmunocomplejos circulantes, anticuerpos frente a proteínas víricas, con la respuesta autoinmune en pacientes transplantados bajo terapia inmunosupresora o con la respuesta inmune en individuos sanos. La oligoclonalidad es una cualidad cualitativa, por lo que puede existir oligoclonalidad con hipo, normo o hipergamaglobulinemia.

**3. Monoclonales:** Se reflejan como bandas estrechas o densas, ubicadas generalmente en la fracción beta o gamma.

### ***Gammapatías monoclonales*** (GM)

Estas gammapatías constituyen un grupo de patologías caracterizadas por la proliferación benigna o maligna de un clon de células plasmáticas que produce una Ig (intacta o un fragmento de ella), homogénea desde el punto de vista inmunoquímico y electroforético, a la que se conoce como **componente monoclonal** (CM). Esta proteína, que generalmente puede detectarse en sangre u otros líquidos biológicos, está compuesta por dos cadenas pesadas de la misma clase (gamma; alfa; mu; delta o epsilon) y subclase y por un sólo tipo de cadena ligera ( $\kappa$ ,  $\lambda$ ). Se pueden presentar distintos grados de hipogammaglobulinemia.

Las GM pueden clasificarse en clínicamente **activas**, incluye al mieloma múltiple (MM) y sus variantes, enfermedades linfoproliferativas -como la macroglobulinemia de Waldenström (MW), leucemia linfocítica crónica y linfoma no Hodgkin- y a otras enfermedades como amiloidosis, crioglobulinemias y coagulopatías, y clínicamente **silentes**, como las gammapatías monoclonal de significado incierto o las gammapatías monoclonales transitorias -asociadas a infecciones víricas o reacciones de hipersensibilidad a drogas-. Las dos entidades clínicas sintomáticas más importantes vinculadas a trastornos de células B maduras son el MM y la MW.

Los estudios de laboratorio aplicados al diagnóstico y seguimiento de las GM son:

- Cuantificación de proteínas totales y albúmina.
- PE en suero y/u orina, en soporte de agarosa o acetato de celulosa.
- IF en suero y/u orina con antisueros monoespecíficos IgM, IgA, IgG, IgD, IgE y cadenas livianas kappa y lambda. Comprobación y cuantificación del CM.
- Cuantificación de Igs séricas.
- Cuantificación de CLL en suero y/u orina (la determinación de CLL en suero resulta fundamental para el control de pacientes con MM no secretor, así como en el diagnóstico y seguimiento de la amiloidosis primaria).
- Cálculo del cociente kappa/lambda.

Los distintos tipos de respuesta terapéutica se establecen a través de la variación en la concentración sérica del CM. La determinación cuantitativa de los niveles séricos de **beta2-microglobulina** es importante para la estadificación del paciente con MM y como factor pronóstico.

Complementan el diagnóstico la citomorfología del aspirado de médula ósea, el hemograma, la evaluación de la función renal y las técnicas radiológicas. La caracterización de marcadores en los clones tumorales mediante citometría de flujo ha permitido una mejor tipificación de las distintas GM, facilitando así su diagnóstico diferencial. Los marcadores más empleados son CD38, CD138, CD56, CD19, CD27, CD28, CD45, CD117, CD200 y CD221.

### Uroproteínograma

La orina contiene cantidades mínimas de proteínas (proteinuria fisiológica) principalmente albúmina y la proteína tubular de Tamm-Holmfman (Figura 5). La presencia de proteínas en la orina se denomina proteinuria y en adultos se define clínicamente por una excreción urinaria de proteínas superior a 150 mg/24 h.

El fraccionamiento electroforético en función de la carga se realiza en acetato de celulosa gelatinizado o en soporte de agarosa se denomina **uroproteínograma electroforético** (URO) y es de utilidad para la clasificación de las proteinurias en glomerulares, tubulares y por sobrecarga. En estas últimas se requiere identificar adicionalmente las proteínas mediante electroinmunofijación (EIF). La evaluación de la proteinuria se debe solicitar en orina de 24 h. En función del soporte y colorante empleado, será necesario o no concentrar la orina.

El URO proporciona una información fidedigna sobre la localización y el grado de lesión en la nefrona, además de definir perfiles urinarios en pacientes con GM. En el MM, por ejemplo, el daño renal en se debe principalmente a los efectos tóxicos de las CLL. La nefropatía por cilindros de cadenas livianas (riñón de mieloma), caracterizada por inflamación y fibrosis tubulointersticial, es la forma más común de enfermedad renal asociada a MM.

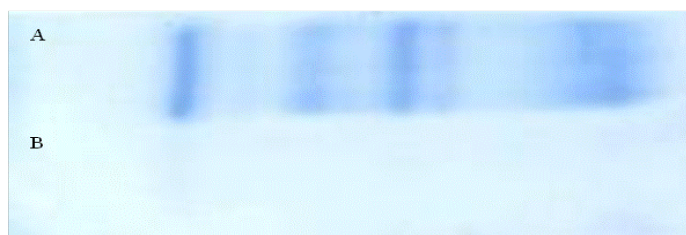


Figura 5. Proteínograma electroforético en acetato de celulosa (A) suero del paciente como control del ensayo. (B) proteinuria fisiológica.

### **Clasificación de los distintos tipos de proteinuria**

**1- Proteinuria glomerular.** Puede ser de dos tipos:

1-a) Selectiva: Alteración en la barrera eléctrica glomerular, pero sin daño en su estructura histológica. Detección de una banda en la zona de la albúmina y a veces una fina banda de transferrina.

1-b) No selectiva: alteración en la ultraestructura glomerular, filtran proteínas de todos los tamaños como albúmina y globulinas. Patrón similar al del suero. Se detecta en glomerulopatías primarias y secundarias.

### **2- Proteinuria Tubular**

Secundaria a una alteración en los mecanismos de reabsorción y/o procesamiento tubular de las proteínas. Se recuperaran en la orina aquellas proteínas de bajo peso molecular (alfa1-microglobulina, beta2-microglobulina, retinol binding protein (21 KDa), CLL kappa y lambda. Puede preceder a la glucosuria, aminoaciduria o a la fosfaturia.

### **3- Proteinuria Mixta**

Se caracteriza por la presencia simultánea de proteínas marcadoras de afectación renal tubular y glomerular. Los tipos mixtos son frecuentes en enfermedades renales avanzadas, dado que alteraciones primarias del glomérulo pueden acabar afectando al intersticio tubular y viceversa.

### **4- Proteinuria por sobrecarga filtrada**

En situaciones en las que aumenta la concentración plasmática de una proteína de bajo peso molecular, su carga filtrada puede superar la capacidad de reabsorción del túbulo proximal para esa proteína y provocar una proteinuria específica. Esto puede ocurrir por producción anómala o excesiva.

Las afecciones post-renales añaden a la orina proteínas séricas no filtradas por el glomérulo y por ello simulan proteinurias glomerulares o mixtas. La adición post-renal de proteínas puede ser identificada por la presencia en orina de moléculas muy grandes (alfa2-macroglobulina, IgM, apolipoproteína A) que están casi completamente ausentes del filtrado incluso en fases avanzadas de la enfermedad glomerular.

### **Electroinmunofijación de proteínas urinarias**

Esta metodología permite detectar y tipar proteínas de Bence Jones (CLL monoclonales kappa y/o lambda) o cualquier otra Ig completa monoclonal, tipar lesiones renales (lesión tubular, glomerular o mixta) y cuantificar el CM.

La técnica *hydragel urine profil* (Sebia®) está basada en el principio de la electroforesis en gel de agarosa seguida de IF. Después de la separación de las proteínas

urinarias según su carga, el gel es incubado con diferentes antisueros específicos dirigidos contra:

- Proteínas séricas de bajo peso molecular que indican daño tubular:
  - Beta2-microglobulina,
  - Proteína de Unión al Retinol (RBP)
  - Alfa1-microglobulina
- Proteínas séricas de alto peso molecular que indican daño glomerular:
  - Cadenas pesadas gamma, alfa y mu (con un antisuero trivalente)
  - Cadenas pesadas delta y épsilon (con un antisuero divalente)
  - Albúmina
- Alfa2-macroglobulina, que indica contaminación sanguínea de la orina
- Cadenas ligeras libres y ligadas Kappa ( $\kappa$ ) y Lambda ( $\lambda$ )
- Cadenas ligeras libres Kappa ( $\kappa$ ) y Lambda ( $\lambda$ ).

Luego el gel es procesado para eliminar las proteínas no unidas antes de la etapa final de coloración. El gel es examinado visualmente y el pico monoclonal puede ser cuantificado leyendo el carril marcador de peso molecular (ELP). (Figura 6)

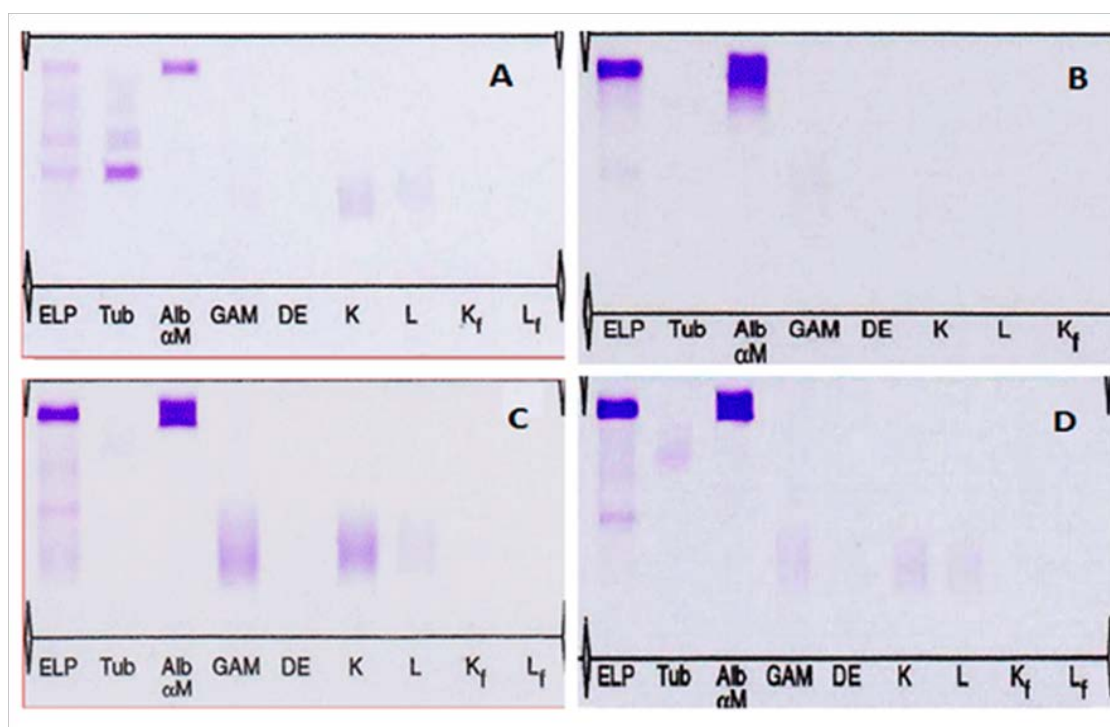


Figura 6. Análisis de la proteinuria mediante inmunofijación en gel de agarosa. A) Proteinuria tubular; B) Proteinuria glomerular selectiva; C) Proteinuria glomerular no selectiva y D) Proteinuria mixta con marcado patrón glomerular. ELP: patrón de peso molecular; Tub: proteína tubular; Alb $\alpha$ M: fracción de albúmina y  $\alpha$ -microglobulina; GAM: complejo de inmunoglobulinas G, A, M; DE: inmunoglobulinas D y E; K: cadena liviana kappa asociada; Y: cadena liviana lambda asociada; K<sub>f</sub>: cadena liviana kappa libre; Y<sub>f</sub>: cadena liviana lambda libre ([www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/355](http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/355)).

### Electroforesis de proteínas urinarias

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), que separa las proteínas urinarias según su peso molecular, es un método de alta resolución para la tipificación de los perfiles proteicos urinarios. Sin embargo, no ha sido rutinariamente adoptado en la mayoría de los laboratorios clínicos (Figura 7).

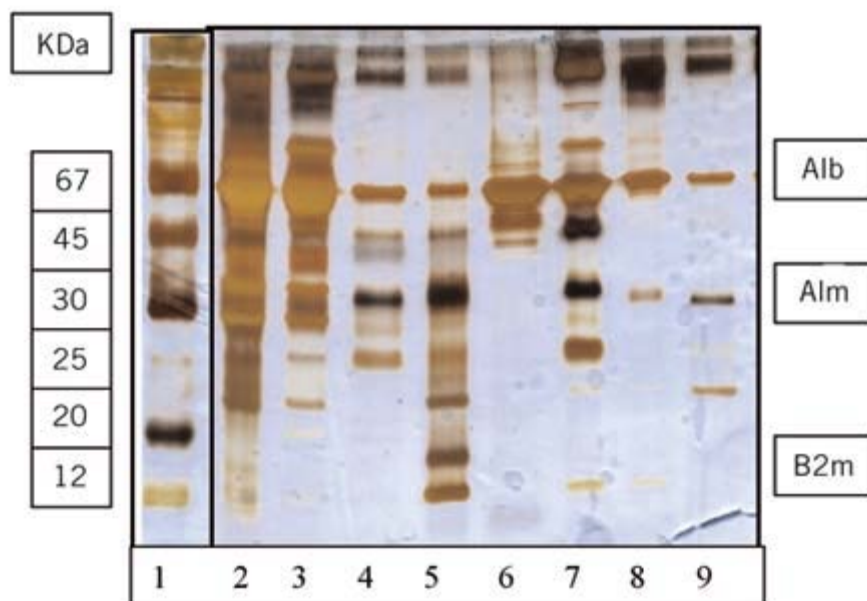


Figura 7. Distintos perfiles uroproteicos observados en el SDS-PAGE (tinción argéntica). 1: control de PM; 2, 3 y 7: mixto; 4, 5, 8 y 9: distintos perfiles tubulares; 6: glomerular. Alb: Albúmina, Alm: alfa1-microglobulina, B2m: beta2-microglobulina. Acta Bioquím Clín Latinoam 2006; 40: 383-90.

***Ante alteraciones en el perfil del URO, se deberá realizar la determinación de proteínas trazadoras por nefelometría o inmunoturbidimetría***

- Proteínas trazadoras de desorden glomerular: Albúmina (67 KDa), Transferrina (90 KDa), IgG (KDa).
- Proteínas trazadoras de desorden tubular: alfa1-microglobulina (33KDa), beta2-microglobulina (12KDa), retinol binding protein (21KDa), CLL kappa y lambda (25KDa).

## ACTIVIDAD PRÁCTICA

- Determinar proteínas totales y albúmina en suero por método colorimétrico.
- Realizar un Proteinograma por electroforesis. Interpretación de resultados.

### a) DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

La medición de las proteínas incluye la medición de proteínas totales, albúmina, globulinas, y de la razón albúmina/globulina [albúmina/(proteínas totales – albúmina)].

#### FUNDAMENTO

Los enlaces peptídicos de las proteínas reaccionan con el ión cúprico, en medio alcalino, para dar un complejo color violeta con máximo de absorción a 540 nm, cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas totales en la muestra.

#### MUESTRA

##### - Suero

- Recolección de la muestra: debe obtenerse libre de hemólisis.
- Sustancias interferentes: en la determinación de proteínas no se observa interferencia por bilirrubina hasta 100 mg/L y en ningún caso se presenta turbiedad por quilomicrones.
- Estabilidad y almacenamiento: si no se procesa inmediatamente el suero puede conservarse hasta 3 días en refrigerador (2-10 °C) o una semana en congelador.

#### ***Variables que influyen en la toma de muestra:***

- Suero venoso frente a suero capilar: no hay diferencias.
- Suero frente a plasma: este último tiene 2 g/L más debido al fibrinógeno (no considerado dentro de las proteínas totales)
- Posición horizontal frente a la posición vertical: individuo acostado tiene menor valor que el mismo individuo de pie, debido a la hemoconcentración en posición erecta.
- Ejercicio: produce un aumento del 6 al 12%.
- Edad:
  - Recién Nacido prematuro: 36 a 60 g/L
  - Recién nacido a término: 46 a 70 g/L

- A partir de estas cifras iniciales las proteínas van aumentando poco a poco hasta alcanzar el valor del adulto (61-79 g/L).

- Comida: No hay variaciones posprandiales.

## REACTIVOS

- EDTA/ Cu en medio alcalino: complejo EDTA/Cu 13 mmol/L en NaOH 875 mmol/L y alquil aril poliéter (AAP). El EDTA se usa como complejante del cobre y lleva un éter como estabilizante del reactivo previniendo posibles reducciones.
- Suero patrón: solución de albúmina y globulinas en estado nativo con título conocido de proteínas (Biuret o Kjeldhal).

## MATERIALES

- Espectrofotómetro o fotocolorímetro.
- Micropipetas y pipetas para medir los volúmenes indicados.
- Tubos de fotocolorímetro o cubetas espectrofotométricas.
- Baño de agua a 37 °C

## PROCEDIMIENTO

En tres tubos marcados B (Blanco), S (Estándar) y D (Desconocido), adicionar:

	<b>B</b>	<b>S</b>	<b>D</b>
<b>Agua destilada</b>	50 µL	-	-
<b>Suero Patrón</b>	---	50 µL	-
<b>Muestra</b>	---	-	50 µL
<b>EDTA / Cu</b>	3,5 mL	3,5 mL	3,5 mL

- Mezclar con varilla. Incubar durante 15 minutos a 37 °C. Leer en espectrofotómetro a 540 nm. Llevar a cero con el blanco de reactivo. El color de la reacción es estable por 12 h.

### **Curva de Calibración**

Para comprobar una respuesta lineal del espectrofotómetro en la longitud de onda fijada para la reacción, se puede preparar una curva de calibración con cantidades crecientes de suero patrón (por ejemplo: 50 y 100 µl) con un volumen de reactivo de 3,5 ml. Se ha comprobado que cumple la ley de Beer hasta una concentración de 120 g/L.



## DETERMINACIÓN DE ALBÚMINA

La proteína más abundante en plasma es la albúmina, su determinación adicional ofrece más información (en relación al estado nutricional, la capacidad de síntesis por el hígado o a una eventual nefropatía con pérdida de proteínas) que la de proteínas totales.

Una de las funciones más importantes es la de permitir el transporte de ácidos grasos, hormonas esteroideas, bilirrubina y catecolaminas, que en forma libre son insolubles en medio acuoso. Por otra parte, la concentración de albúmina influye notablemente en el mantenimiento de la presión coloidosmótica.

La albúmina tiene la capacidad de unirse a ciertos colorantes o a indicadores en forma selectiva a través de fuerzas de unión intermolecular como las de Van der Waals y electrostáticas. Es condición indispensable que dichas sustancias presenten una asociación fuerte con albúmina y despreciable a otras proteínas. Por ejemplo, con naranja de metilo puede unirse la fracción gamma y beta, si se compara con la electroforesis, da valores más altos y no es aconsejable. Con fenoftaleína, cuando la albúmina es menor de 15 g/L la unión es defectuosa, da valores disminuidos. El verde de bromo cresol a pH 7, presenta buena correlación con la electroforesis. Con bromocresol sulfoftaleína a pH 3,8 no interfieren globulinas, y es el que se describe a continuación.

### FUNDAMENTO

La albúmina reacciona específicamente -sin separación previa- con la forma aniónica de la 3,3',5,5'-tetrabromo cresolsulfonftaleína (BCF), en presencia de un exceso de colorante, en medio tamponado a pH 3,8. El aumento de absorbancia a 625 nm respecto del blanco de reactivo, es proporcional a la cantidad de albúmina presente en la muestra.

### REACTIVOS

- Reactivo BCF: solución de 3,3',5,5'-tetrabromo cresolsulfonftaleína (en polioxietilén lauril éter).
- Suero Patrón: Solución de albúmina y globulinas en estado nativo con título conocido de albúmina.

### MATERIALES

- Espectrofotómetro o fotocolorímetro.
- Micropipetas y pipetas para medir los volúmenes indicados.
- Tubos de fotocolorímetro o cubetas espectrofotométricas.



VALORES DE REFERENCIA

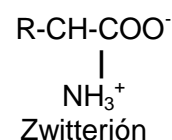
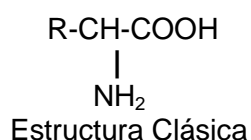
Proteínas totales: 61 – 79 g/L

Albumina: 35 – 48 g/L

Relación A/G: 1,2 – 2,2

**b) PROTEINOGRAMA POR ELECTROFORESIS**

Las proteínas son estructuras anfóteras y tienen cargas negativas y positivas en las mismas moléculas, cuyo número depende del pH de la solución. En el intervalo de pH cercano a la neutralidad el carboxilo está disociado y el grupo amino enlaza al hidrógeno dando origen a una molécula ionizada con cargas (-) y (+) llamada *Zwitterion*.



El pH en el cual el número de cargas positivas es igual al de las negativas se denomina *Punto Isoeléctrico* (pI). A pH por debajo del mismo, las cargas positivas exceden en número a las negativas y la proteína se comporta como catión (+). Por encima del pI, predominan las cargas negativas y la proteína se comporta como anión (-). Esta propiedad de las proteínas se aplica en la electroforesis para la identificación de las distintas proteínas séricas. La electroforesis puede ser libre o sobre soporte.

pH < pI	pH = pI	pH > pI
$\begin{array}{c} \text{R-CH-COOH} \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{R-CH-COO}^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{R-CH-COO}^- \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Carga neta: +1 (catión)	0	-1 (anión)

**Electroforesis**

La electroforesis es una técnica basada en los movimientos de moléculas cargadas en un campo eléctrico, cada molécula se mueve hacia el electrodo de carga opuesta (cátodo y ánodo), este movimiento denominado “electroforesis”. En el transporte electroforético, a la fuerza del campo eléctrico se opone la resistencia viscosa del medio, produciéndose, cuando se igualan una velocidad constante de desplazamiento de las partículas.

El grado de migración depende de factores tales como: (1) la carga neta de la molécula, (2) el tamaño y forma de la molécula, (3) la fuerza del campo eléctrico, (4) las propiedades del medio de soporte, y (5) la temperatura del medio.

Los medios de soporte proveen la matriz en la cual se produce la separación de las proteínas. Los más utilizados en la electroforesis son el papel filtro, acetato de celulosa, agarosa, poliacrilamida.

### **Electroforesis en acetato de celulosa**

Se usa para la separación y caracterización de proteínas y otras moléculas. El soporte consiste en tiras delgadas de acetato de celulosa, con propiedades de adsorción mínimas, por lo que se evita la formación de colas y los solutos pueden ser separados en bandas bien definidas. Otras ventajas son:

- 1) La separación es muy rápida
- 2) Se pueden analizar cantidades de muestra pequeñas
- 3) Las tiras pueden hacerse transparentes
- 4) La tira se puede disolver, recuperando los componentes separados
- 5) Presentan un fondo bajo cuando se separan compuestos radiactivos

Entre sus desventajas figuran que captan poca agua y son más susceptibles a la evaporación que el papel. Son también más susceptibles al flujo electro-endosmótico.

Las proteínas de suero se pueden separar mediante esta técnica. Sus  $pI$  están entre 4,9 (albúmina) y 7,4 (gamma-globulinas). Al realizar la electroforesis con un tampón de  $pH = 8,6$ ; todas las proteínas del suero tendrán carga negativa. La albúmina, al tener el  $pI$  más alejado del  $pH$ , tiene más carga negativa y avanza más rápido, quedando más cerca del polo positivo que las gamma-globulinas, que migran muy poco por ser el  $pH$  próximo a su  $pI$ . Las restantes proteínas séricas quedan situadas entre estas dos.

### **MUESTRA**

- **Suero**

### **MATERIALES**

- Tiras de acetato de celulosa (cellogel). Una vez abierto el envase de plástico, las tiras deben conservarse en un recipiente con tapa hermética sumergidas en una solución de metanol al 40%.
- Puentes de papel de filtro Whatman N° 42 o similar.
- Cubeta de electroforesis - Aplicador
- Fuente de electroforesis – Pinzas

## REACTIVOS

- Buffer pH 8,6
 

Veronal Sódico	8,24 g
Agua destilada csp	1000 mL
  
- Azul de bromofenol al 0,2 % en buffer
- Amidoblack 0,5%
- Amidoblack
 

	0,5 g
Metanol	45 mL
H <sub>2</sub> O	5 mL
AcH	10 mL
  
- Decolorante
 

Metanol	45 mL
H <sub>2</sub> O	45 mL
AcH	10 mL
  
- Transparentador
 

Metanol	87 mL
AcH	12 mL
Glicerina	1 mL
  
- Eluente
 

AcH al 80% en agua	
--------------------	--

## PROCEDIMIENTO

Los pasos a seguir en una electroforesis son como se presenta en la Figura 8:

### 1- Electroforesis

- a) Utilizar como soporte el acetato de celulosa.
- b) Saturar las tiras en buffer 15 minutos antes de su uso, para su equilibrado.
- c) Eliminar el exceso de buffer colocando las tiras entre dos hojas de papel de filtro, con cuidado de que no lleguen a secarse por completo.
- d) Extender las tiras sobre el puente de la cubeta de modo que la superficie de la parte penetrable quede hacia la parte superior. El lado penetrable es el que se ve cuando la tira se coloca en vertical delante del operador con el corte en la esquina inferior derecha. Utilizar como puente papel Whatman N° 42 (opcional).
- e) Depositar con ayuda del aplicador dos muestras de suero en cada tira, en el extremo próximo al cátodo. Si se siembra con sembradores usar suero sin diluir.
- f) Conectar la corriente, aplicando una diferencia de potencial de 200 voltios, constante independiente de la cantidad de tiras colocadas, corrida 30 minutos. Si se coloca alta intensidad se pierde resolución entre las distintas bandas.

**2- Revelado**

Finalizada la separación, depositar las tiras en una cubeta con solución de tinción, de modo que queden cubiertas por el líquido, durante no más de 5 minutos. Recuperar el colorante.

**3- Decoloración**

Lavar las tiras con solución de decolorante hasta que se observen bien las bandas de proteínas (azules) sobre un fondo blanco. Dejar allí las tiras sembradas hasta su cuantificación. Recuperar el decolorante usado.

**4- Transparentado** (Se realiza en caso de guardar la corrida).

Estirar bien las tiras. Colocarlas 3 a 5 minutos en el baño de transparencia. Dejar secar a temperatura ambiente o estufa a 70° C.

**5- Elución**

Cortar cada fracción, colocarlas en tubos de ensayo y agregarles 5 mL de eluente. Mezclar bien. Dejar 20 minutos a 37° C, volver a mezclar y leer a 620 nm.

**Nota:**

Si no se cuenta con los elementos para la determinación por densitometría, se realiza una cuantificación por elución. La representación gráfica de las fracciones proteicas del suero sanguíneo se denomina **Proteinograma** (Figura 9).

De acuerdo a su migración (soporte de acetato de celulosa), las proteínas se agregan en 5 ó 6 zonas o bandas correspondientes a: albúmina, alfa1 ( $\alpha_1$ ), alfa2 ( $\alpha_2$ ), beta ( $\beta$ ), gamma ( $\gamma$ ). En la región de las  $\beta$ -globulinas frecuentemente se visualizan dos bandas constituidas por banda  $\beta_1$  (transferrina) y banda  $\beta_2$  (complemento C3), especialmente si el suero es fresco y no ha ocurrido la degradación de las proteínas lábiles del complemento. Si se utiliza plasma en vez de suero aparecerá una sexta banda correspondiente al fibrinógeno, la cual se observa entre la región  $\beta$  y  $\gamma$ .

**CÁLCULOS**

Ejemplo:	Absorbancia de las distintas fracciones
Albúmina .....	0,600
Alfa 1 globulinas .....	0,060
Alfa 2 globulinas .....	0,080
Beta globulinas .....	0,090
Gamma globulinas .....	<u>0,120</u>
<b>TOTALES.....</b>	<b>0,950</b>

- Se aplica regla de tres para obtener los valores relativos de albúmina y de las fracciones:

0,950 total de Abs. .... 100%  
 0,600 Abs de albúmina ..... X = 63% de albúmina

- Realizar regla de tres para obtener valores absolutos.

Por método químico se determinó Proteínas Totales (por ejemplo dieron 72,4g/L)

100% ..... 72,4 g/L  
 63% de albúmina ..... X = 45,6 g/L de albúmina

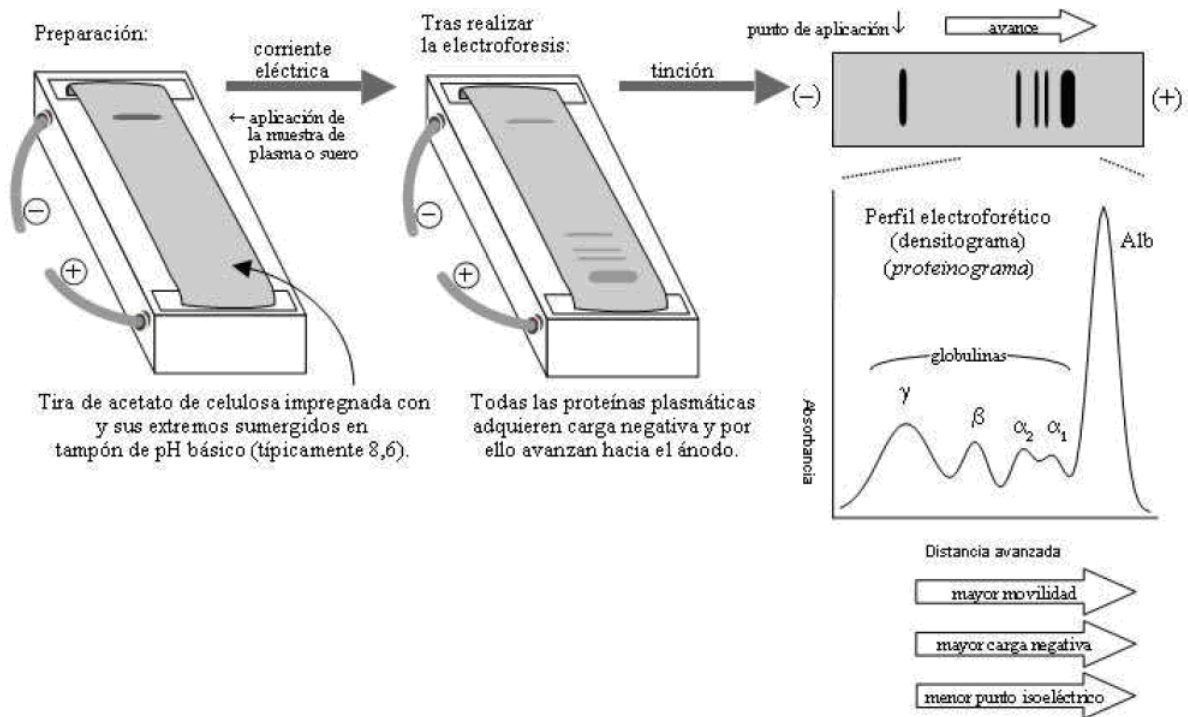


Figura 8. Análisis de proteínas plasmáticas por electroforesis en acetato de celulosa

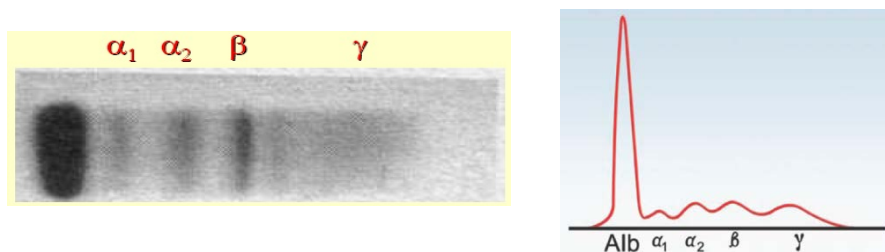


Figura 9. Proteinograma normal y su densitometría. Modificado de Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis. David F Keren, 2003 Edward Arnold (Publishers).

**VALORES DE REFERENCIA**

En suero humano la composición proteica es:

	Valor Relativo (%)	Valor absoluto (g/L)
Albúmina.....	55-65	43-53
Alfa 1 globulinas .....	3-5	3-5
Alfa 2 globulinas .....	6-9	5-7
Beta globulinas .....	9-14	7-9
Gama globulinas .....	14-19	10-14

**APLICACIONES**

La electroforesis de proteínas séricas con acetato de celulosa es una técnica simple, útil para el diagnóstico de cirrosis hepática, síndrome nefrótico, mieloma múltiple, etc.

A continuación se muestran los proteninogramas característicos de diferentes patologías (Figuras 10 a 15).

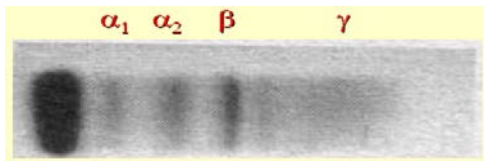


Figura 10. Proteinograma normal

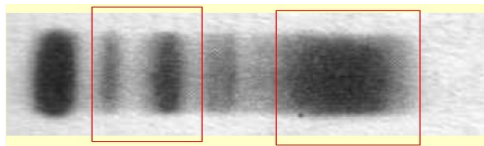


Figura 11. Reacción inflamatoria (etapa crónica): caracterizada por aumentos a nivel de  $\alpha$ -1,  $\alpha$ -2 y gamma.

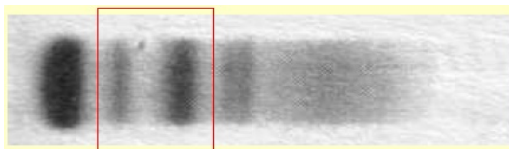


Figura 12 .Reacción Inflamatoria (fase aguda): caracterizada por aumento extremo de proteína C reactiva (PCR) y proteína S amiloide del suero (SAA) con aumento moderado de  $\alpha$ 1-antitripsina,  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida, ferritina, IgG, complemento (C3 y C4) y ceruloplasmina; y disminución de albúmina y transferrina, lo que se traduce en aumento a nivel de  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2, sin aumento en la fracción gamma.



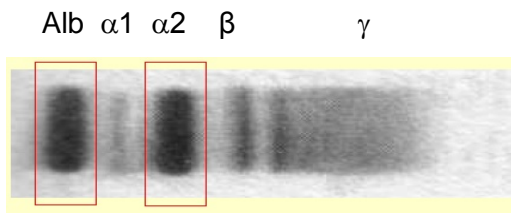


Figura 13. Síndrome nefrótico: caracterizado por un descenso a nivel de la fracción de albúmina y aumento a nivel de la fracción  $\alpha_2$

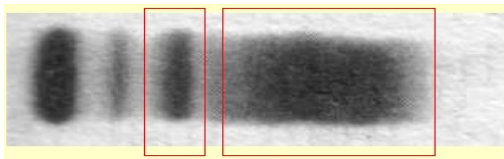


Figura 14. Cirrosis o hepatopatía crónica: con aumento a nivel de  $\alpha_2$  y gamma que describen una curva continuada ascendente denominada solapamiento beta-gamma.



Figura 15. a) Proteingrama patológico: Banda monoclonal. Mieloma múltiple. b) Proteingrama normal

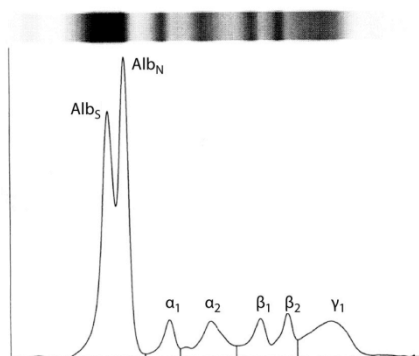


Figura 16. Bisalbuminemia: doble pico a nivel de la fracción de albúmina sin significación a nivel clínico (Revista cubana de hematología, inmunología y hemoterapia 2016; 32: 20-25).

## RESOLUCIÓN DE CASOS CLÍNICOS

### Caso 1

Varón de 77 años, fumador, con antecedentes de carcinoma en cuerda vocal izquierda, es remitido al servicio de Medicina Interna por presentar desde hace seis meses astenia intensa, anorexia y dolores óseos generalizados en extremidades y parrillas costales que aumentan con el movimiento. En la exploración física la auscultación cardiaca es normal. En el abdomen no se palpa hepatoesplenomegalia.

#### Resultados de laboratorio:

Hemograma: dentro de los VR. Eritrosedimentación (VSG): 111 mm/h. CPK y aldolasa: dentro de los VR. Urea: 48mg/dL; creatinina; 0,9 mg/dL y calcio: 10 mg/dL. Determinación de hormonas tiroideas (T4, TSH), paratohormona (PTH), vitamina B12, ácido fólico, marcadores tumorales (CEA, PSA y alfafetoproteína): todos estos parámetros se encuentran dentro de los VR.

Proteínas totales: 9 g/dL. Proteinograma: albúmina 3,5 g/dL (VR: 3,7-5,3), alfa1-globulina: 0,2 g/dL, alfa2-globulina: 0,5 g/dL, beta-globulina: 0,5 g/dL y gammaglobulinas: 4,4 g/dL (VR: 0,6-1,6) con presencia de una banda monoclonal en la región gamma. Proteínas en orina: 2.550 mg/24h. Cuantificación de las inmunoglobulinas: IgA 5.070 mg/dL (VR: 90-395), IgG: 366 mg/dL (VR: 840-1.600) e IgM: 29 mg/dL (VR: 48-220). Proteinuria de Bence-Jones: positiva.

#### 1- Discusión del Caso:

- a) ¿De qué patología se trata?
- b) ¿Qué otras pruebas de diagnóstico propone?

### Caso 2

Paciente de 60 años acude al médico argumentando tener los siguientes síntomas desde hace un mes: fatiga, malestar en general, falta de apetito, pérdida de peso. Al momento de la consulta presenta ictericia en piel y mucosa, coluria y acolia. Bebedor ocasional.

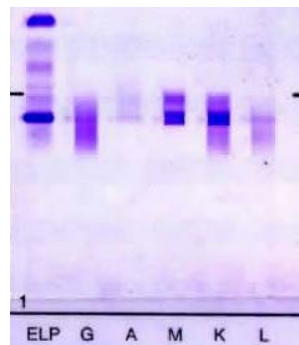
**Datos de laboratorio:** GOT, GPT,  $\gamma$ GT, FAL, bilirrubina total y bilirrubina directa: aumentadas. Proteínas totales: normales, albúmina: disminuida. En el proteinograma por electroforesis se observa: albúmina: disminuida; alfa1-globulinas: disminuida; fracción alfa2: normal; fracción beta: disminuida; fracción gamma: Igs muy elevadas. Se observa aumento de la IgA, seguido por IgM y luego IgG, pero como la IgA e IgM migran abarcando la zona beta2 y gamma rápida, se observará en el PG una unión o puente beta-gamma. La IgA aumenta hasta el triple de su concentración normal.

#### 1- Discusión del Caso:

- a) ¿Qué diagnóstico propone?
- b) ¿Qué parámetro bioquímico caracteriza a la patología mencionada en el ítem a)?

### Caso 3

Varón de 66 años de edad que acude al servicio de emergencias con cuadro de fatiga, pérdida de peso, poliartralgias y visión borrosa en ambos ojos. Refiere mareos frecuentes y sensación de vértigo. **Datos de laboratorio:** Hemograma: hemoglobina 14 g/dL; hematocrito: bajo; plaquetas: 85.000 /mm<sup>3</sup>; fenómeno de Rouleaux. VSG: 95 mm/h; creatinina: 2,5 mg/dL; proteínas totales: 11,4 g/dL; albúmina: 3,4 g/dL. Inmunoglobulinas: IgG 50 mg/dL (VR: 700 - 1700 mg/dL); IgA 4 mg/dL (VR: 90 - 380 mg/dL); PE: componente monoclonal en región gamma. Se le realizó la electroinmunoforesis, obteniéndose el siguiente resultado:



#### 1- Discusión del Caso:

- ¿De qué patología puede sospecharse?
- Grafique el PE encontrado en el paciente.
- ¿Qué otras pruebas de diagnóstico propone?
- El paciente presenta crioglobulinas positivas. ¿Qué parámetros de laboratorio sugerirían esta condición?

#### BIBLIOGRAFÍA

- PROTEINURIA EN GAMMAPATÍAS MONOCLONALES. M Morales y O Agramonte Llanes. Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia 2016; 32:160-175.
- MEDICINA DE LABORATORIO. FUNDAMENTOS Y APLICACIONES EN EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO. I Antonozzi y E Gulletta. 1ª Edición. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires 2015.
- EL LABORATORIO EN EL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE LAS GAMMAPATÍAS MONOCLONALES. M Pizzolato. Hematología 2014; 18: 9–11.
- HARRISON PRINCIPIOS DE MEDICINA INTERNA. DL Longo, AS Fauci, DL Kasper, SL Hauser, JL Jameson, J Loscolzo J. 18ª Edición. Ed. Mc. Graw Hill, España 2012.
- EL LABORATORIO EN EL DIAGNOSTICO CLINICO. JB HENRY. 20ª Edición. Ed. Marbán, España 2010.
- TIETZ TEXTBOOK OF CLINICAL CHEMISTRY AND MOLECULAR DIAGNOSTICS. C Burtis, E Ashwood y D Bruns. 4ª Edición. Ed. Saunders Elsevier, México 2006.

## TRABAJO PRÁCTICO N° 8

### EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN HEPÁTICA Y PANCREAS EXOCRINO

### DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS



#### OBJETIVOS

- Conocer los fundamentos y realizar las pruebas bioquímicas más utilizadas para evaluar la función hepática y pancreática.

#### INTRODUCCIÓN

El hígado es el órgano de mayor tamaño y complejidad metabólica del organismo. Participa en numerosas funciones biosintéticas, catabólicas, detoxificadoras, digestivas e inmunológicas (Figura 1). Su disfunción primaria o secundaria se asocia con la aparición de enfermedad, que está en relación con la gravedad de la afección y la reserva funcional previa. La enfermedad hepática puede ser provocada por agentes infecciosos (virus), tóxicos (fármacos), patología de la vía biliar, patología vascular, enfermedades sistémicas o una situación fisiológica especial que determina un cambio sustancial en el perfil hormonal del individuo, como es el embarazo.

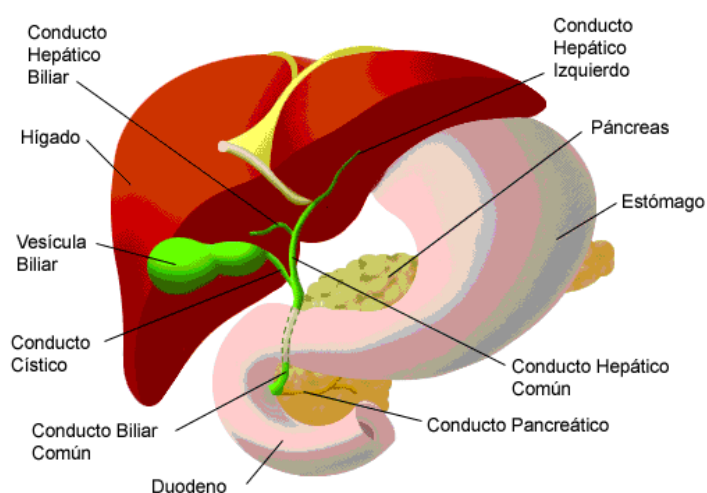


Figura 1. Sistema Hepato-biliar. ([www.es.123rf.com/photo\\_24211324\\_anatomía](http://www.es.123rf.com/photo_24211324_anatomía))

Histológicamente, el hígado está compuesto por un gran número de unidades hexagonales llamadas “lobulillos hepáticos” formados por láminas fenestradas de hepatocitos, que se ubican cerca de sinusoides sanguíneos, los cuales se anastomosan en forma radial hacia las venas centrolobulillares (Figura 2). El flujo sanguíneo del hígado llega por la vena porta, que procede del intestino. Las ramas portales se encuentran adyacentes a las ramas de la arteria hepática y los conductos biliares formando la *tríada portal*. La sangre que sale del hígado entra en el sistema venoso a través de la vena hepática. El componente biliar del hígado comprende la vesícula biliar y los conductos biliares.

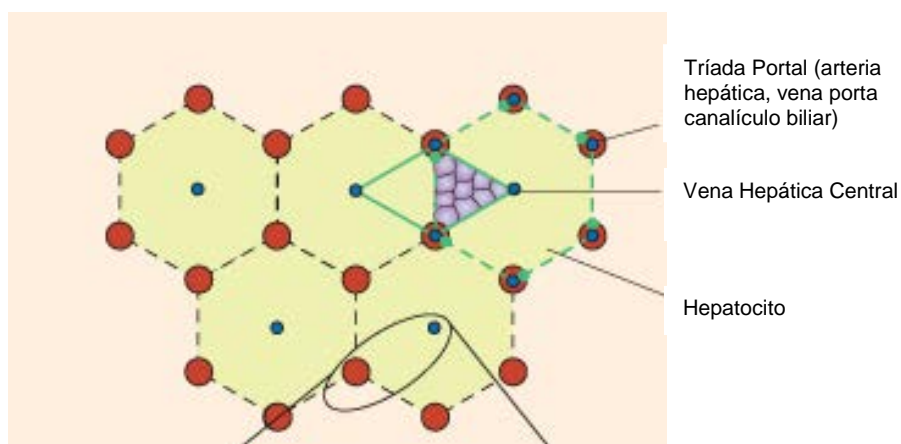


Figura 2. Esquema de la estructura del Hígado.  
([www.es.123rf.com/photo\\_24211324\\_anatomía](http://www.es.123rf.com/photo_24211324_anatomía))

Las vías biliares tienen su origen en diminutos canalículos biliares que se forman entre hepatocitos adyacentes. La bilis que excreta el hígado es recolectada por finos canalículos que confluyen en otros de mayor calibre. Cada lóbulo del hígado (derecho e izquierdo) tiene su conducto biliar hepático, ambos se funden en un conducto hepático común, el cual se une al conducto cístico (procedente de la vesícula biliar) para formar el colédoco. Este conducto, encargado de llevar la secreción biliar, durante su trayectoria se acopla al conducto pancreático, y antes de desembocar en el duodeno, se dilata y forma la ampolla de Vater, cuya abertura está regulada por el esfínter de Oddi. La obstrucción del flujo de la bilis en cualquier punto de este sistema produce el característico cuadro clínico y bioquímico de “**Colestasis**”.

## FUNCIONES DEL HÍGADO

1. **Metabolismo de Hidratos de Carbono:** regulación de la homeostasis de glucosa sanguínea a través de los procesos de gluconeogénesis, glucogenólisis y glucogénesis.
2. **Metabolismo de Lípidos:** síntesis de lipoproteínas, fosfolípidos, colesterol, triglicéridos. Biosíntesis de ácidos biliares a partir de colesterol.
3. **Síntesis de proteínas plasmáticas:** como albúmina y lipoproteínas. Además de proteínas de fase aguda implicadas en respuesta a la infección o inflamación.
4. **Síntesis de factores de coagulación:** factores K dependientes (II, VII, IX y X), fibrinógeno y factor V.
5. **Funciones de depósito:** glucógeno. Vitaminas liposolubles (A, D, E y K). Vitaminas hidrosolubles (riboflavina, B12, ácido fólico). Minerales (hierro, cobre y zinc).
6. **Excreción y detoxificación:** pigmentos biliares, colesterol, fármacos, amoníaco, formación de urea, hormonas esteroideas.
7. **Función reticuloendotelial:** las células de Kupffer participan en la fagocitosis. Eliminación de inmunocomplejos.

## ENFERMEDADES HEPÁTICAS

Es necesario considerar que la enfermedad hepática es a menudo clínicamente silente hasta períodos tardíos de su curso.

### CLASIFICACIÓN

**a) Enfermedad hepatocelular:** con o sin disfunción hepática demostrable.

Se caracteriza por daño o lesión del hepatocito. Esta puede variar desde zonas de necrosis focal hasta la destrucción de la mayor parte del órgano conduciendo a la insuficiencia hepática.

Las causas más frecuentes:

- Hepatitis Agudas: de origen viral o alcohólica. Mononucleosis. Septicemia.
- Hepatitis Crónicas: viral o autoinmunes.
- Acción de toxinas: hidrocarburos clorados, fósforo. Fármacos.
- Ictericia Obstructiva (obstrucción biliar): alteración secundaria del hepatocito.
- Congestión Hepática y/o Hipoxia: insuficiencia cardiaca congestiva. Shock.
- Destrucción celular de origen conocido o desconocido seguida de Cirrosis.

## b) Enfermedad Colestásica

**Colestasis:** se define como el “Síndrome asociado con la incapacidad de la bilis para alcanzar el duodeno”. Las causas pueden ser intrahepáticas (no quirúrgicas) y extrahepáticas (quirúrgicas).

- I. **Intrahepática:** asociada a la destrucción del hepatocito. Hepatitis víricas. Fármacos. Embarazo. Cirrosis.
- II. **Extrahepática:** cálculos en colédoco. Carcinoma de cabeza de páncreas. Fibrosis de conducto biliar. Compresión externa por un tumor. Atresia extrahepática de conducto biliar.

## PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE LA FUNCIÓN HEPÁTICA

El **hepatograma** es el conjunto de determinaciones bioquímicas que permite evaluar la función hepática. Se realiza en forma rutinaria en el laboratorio clínico, y en particular para diagnóstico, pronóstico y seguimiento de pacientes con enfermedad hepática.

Dentro de las **pruebas de función hepática** están incluidas:

### 1- DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS:

- Transaminasas:
  - Aspartato aminotransferasa (AST) o GOT (transaminasa glutámico-oxalacética)
  - Alanina aminotransferasa (ALT) o GPT (transaminasa glutámico pirúvica)
- Fosfatasa alcalina (FAL)
- Gammaglutamil transpeptidasa ( $\gamma$ GT)
- 5' nucleotidasa
- Colinesterasa

### 2- MEDICIÓN DE METABOLITOS:

- Bilirrubina sérica
- Albúmina
- Pruebas de coagulación: tiempo de protrombina (TP)

En general, las pruebas que reflejan las diferentes funciones del hígado orientan hacia la naturaleza del proceso, sin determinar la causa. Como ejemplo: excreción de aniones (bilirrubina), integridad hepatocelular (transaminasas), formación y flujo libre de bilis

(bilirrubina y FAL) y la síntesis proteica (albúmina). Otras determinaciones más especializadas para establecer la posible etiología de la anomalía incluyen serología para virus de hepatitis, estudios del hierro y cobre, niveles de alfa1-antitripsina y autoanticuerpos, entre otras.

<b>Localización de las enzimas en la célula hepática:</b>
✓ <b>MITOCONDRIAS</b>
<b>Aspartato aminotransferasa (AST o GOT)</b>
<b>Glutamato deshidrogenasa</b>
✓ <b>MEMBRANA PLASMÁTICA</b>
<b>Fosfatasa alcalina (ALP: FAL)</b>
<b>γ-Glutamiltranspeptidasa (γGT)</b>
<b>5'-Nucleotidasa (5'-NT)</b>
✓ <b>SOLUBLES EN CITOPLASMA</b>
<b>Alanina aminotransferasa (ALT o GPT)</b>
<b>Aspartato aminotransferasa (AST o GOT)</b>

### 1- EVALUACIÓN DEL DAÑO HEPATOCELULAR

Las transaminasas AST (GOT) y ALT (GPT) son enzimas que están presentes en el organismo con elevada concentración en corazón, hígado, músculo esquelético, riñón y eritrocitos. La actividad sérica en condiciones normales es baja o nula. El aumento de estas enzimas se observa por la alteración de la célula hepática debido a diferentes causas (hepatitis viral, tóxica, etc). Valores muy elevados se presentan en las necrosis hepáticas y moderadamente aumentadas en colestasis y cirrosis.

La AST se halla en la mitocondria y el citoplasma, mientras que ALT en el citoplasma. En el daño hepatocelular moderado la ALT se eleva más que la AST mientras que esta última predomina en daños más acentuados tales como necrosis. Como la ALT tiene una vida media más larga que la AST, los valores elevados persisten en el tiempo.



## 2- EVALUACIÓN DE LA DISFUNCIÓN DE LA CÉLULA HEPÁTICA

**A- Pruebas de conjugación:** determinación de pigmentos biliares

**B- Pruebas que evalúan la función de síntesis:** proteínas plasmáticas y factores de coagulación.

### A- Pruebas de Conjugación

La **bilirrubina** (bili) es un pigmento biliar de color amarillo rojizo que resulta del catabolismo del grupo heme de la hemoglobina, circula en plasma unida a albúmina y es captada por el hígado. A nivel de la membrana del hepatocito la bilirrubina se separa de la albúmina y es transportada por proteínas de unión específica al retículo endoplásmico (microsomal). Allí, es conjugada con el ácido glucurónico (gluconil-transferasa) y forma la **bilirrubina conjugada o directa**. Esta bilirrubina es soluble, no tóxica y se excreta fácilmente a través de la bilis. La bilirrubina libre se denomina **bilirrubina no conjugada o indirecta**. La bilirrubina total en suero equivale a la bilirrubina directa más la bilirrubina indirecta.

La bilirrubina conjugada no está presente en el plasma normal o está en muy pequeñas cantidades, por ello los métodos para su determinación son inexactos a este nivel. Cuando está muy aumentada, por ser hidrosoluble, aparece en orina. Esta bilirrubina conjugada ingresa al intestino con la bilis y es degradada por bacterias produciendo estercobilinógeno que luego se oxida a estercobilina. Una pequeña cantidad de bili es absorbida hacia la circulación portal y la mayor parte es excretada por orina como urobilinógeno que se oxida a urobilina.

- Los valores elevados de bili libre indican sólo destrucción excesiva de eritrocitos.
- En la mayoría de los casos ambas fracciones (directa e indirecta) están aumentadas.
- La presencia de bili en orina indica que la fracción conjugada (directa) está aumentada y es siempre patológico.

El aumento de urobilina o urobilinógeno en orina puede indicar:

- a) Cantidades excesivas de pigmentos biliares que alcanzan el intestino y son reabsorbidos: por ejemplo debido a una hemólisis.
- b) Cantidades excesivas de pigmentos biliares con daño hepático.
- c) Disfunción de la re-excreción de urobilinógeno (Ej: hepatitis).
- d) Puede darse un resultado positivo en una orina normal concentrada.
- e) La ausencia completa de pigmentos biliares en las heces da lugar a excreciones blancas o colestasis (otras causan esteatorrea).

✓ **ICTERIAS: Clasificación**

**Ictericia:** Pigmentación amarilla de la piel debida a una elevación sérica de la bilirrubina.

Las ictericias pueden ser debidas a:

1. **Aumento de la carga de bilirrubina que llega a la célula hepática.** Hay un aumento en la destrucción de los glóbulos rojos (hemólisis) o una excesiva catabolización de eritrocitos inmaduros en medula ósea. La absorción de un gran hematoma tiene el mismo efecto y puede inducir ictericia.
2. **Defecto en la captación y transporte por el hepatocito.** Es la ictericia típica del recién nacido. La reducción en la captación por el hepatocito puede ser un factor importante de la hiperbilirrubinemia. Ej: Enfermedad de Gilbert.
3. **Trastornos de conjugación.** Es un factor contribuyente de la ictericia neonatal, especialmente en prematuros en los que el sistema de la gluconil-transferasa está todavía inmaduro (Síndrome de Crigler-Najjar).
4. **Alteraciones en la excreción de bilirrubina.** Es el grupo más importante y se caracteriza por un aumento de bilirrubina directa e indirecta. La destrucción del hepatocito y las colestasis intra- y extrahepática se incluyen en este grupo, como también el síndrome de Dubin-Johnson.

**B- Pruebas que evalúan la función de síntesis**

- MEDICIÓN DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

**- Albúmina**

La síntesis de albúmina es una función importante del hígado. A medida que avanza la enfermedad hepática, los niveles de la proteína caen como reflejo de una menor síntesis y su concentración posee valor pronóstico.

La **hipoalbuminemia** puede presentarse tanto en hepatopatías agudas como crónicas y es un índice de gravedad de daño. Los valores de albúmina dependen de otros factores como el estado nutricional, catabolismo, factores hormonales y pérdidas urinarias o gastrointestinales, que deben tenerse en cuenta cuando se interpretan los resultados.

**-  $\gamma$ -Globulinas**

Las  $\gamma$ -globulinas aumentan en hepatopatías crónicas, por ejemplo en cirrosis hay aumento de las fracciones  $\beta$  y  $\gamma$  que se fusionan por un aumento de globulinas de movilidad rápida.

- ✓ IgA: aumenta en cirrosis inicial.

- ✓ IgG e IgM: incrementan en estadios cirróticos más avanzados.
- ✓ IgG: aumenta en hepatitis crónicas en actividad.

- FACTORES DE COAGULACIÓN

### **Tiempo de protrombina (TP)**

La síntesis de los factores de la coagulación (excepto el factor VIII) es una función importante del hígado. El daño hepático puede originar un estado hemorrágico o bien las pruebas de coagulación pueden ser anormales.

El TP mide la tasa de conversión de protrombina en trombina (requiere los factores II, V, VII y X) y refleja por lo tanto la capacidad de síntesis hepática. La vitamina K es necesaria para la gammacarboxilación de los factores mencionados. El TP puede estar prolongado en el déficit de vitamina K, terapia con warfarina, enfermedad hepática y coagulopatía de consumo. Es fundamental distinguir si la prolongación del TP se debe a enfermedad hepatocelular o a colestasis crónica con malabsorción de grasas. La manera más útil es mediante la administración de vitamina K, la cual mejorará el TP si la causa es la malabsorción grasa. En enfermedades hepáticas graves existe deficiencia de factores V y I (fibrinógeno) por una fibrinólisis.

## **3- COLESTASIS**

### **Enzimas plasmáticas del conducto biliar:**

- FOSFATASA ALCALINA (FAL)
- 5'NUCLEOTIDASA
- GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA ( $\gamma$ GT)

### **FOSFATASA ALCALINA (FAL)**

La FAL es una enzima ampliamente distribuida en el organismo. Cataliza la hidrólisis de ésteres de fosfatos orgánicos a un pH alcalino óptimo, principalmente a nivel del hígado (fracción termoestable) y huesos (fracción termolábil). También está presente en otros tejidos como intestino, riñón, placenta y leucocitos. Su incremento puede ser fisiológico o patológico. En condiciones fisiológicas, la actividad sérica de fosfatasa alcalina ósea, alcanza su mayor actividad en los niños en edad de crecimiento (3 veces más que en los adultos), en el primer trimestre del embarazo debido al flujo de FAL placentaria, y en los adolescentes (2 veces más que en los adultos).

Entre las patologías que afectan la actividad sérica de FAL se encuentran: obstrucción de conductos biliares, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, colestasis provocada por drogas (esteroides anabólicos), ductopenia biliar del adulto, enfermedad hepática metastática y patología ósea. También puede estar elevada en neoplasias sin compromiso hepático u óseo (se denomina isoenzima Regan) como el cáncer pulmonar.

La FAL hepática está presente en la parte canalicular y luminal del epitelio de los conductos biliares. El aumento en sus niveles es consecuencia de su mayor síntesis y consiguiente liberación en la circulación, aunque puede no observarse hasta uno o dos días después de la obstrucción biliar.

La enzima tiene una vida media de 1 semana, por lo que puede tardar varios días en normalizarse luego de la resolución de la obstrucción biliar. Frente a un incremento sérico de FAL, el primer paso es determinar su origen (existen 8 isoenzimas). Para ello, el método más sensible y específico es la separación electroforética. Otra opción es medir las enzimas 5'nucleotidasa o  $\gamma$ GT, que aumentan en la enfermedad hepática pero no en la ósea. (Ver determinación de FAL en Actividad Práctica).

### **GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA ( $\gamma$ GT)**

La  $\gamma$ GT es una transferasa (carboxipeptidasa) que se encuentra en las fracciones microsomales y membranas celulares de órganos como hígado, riñón, páncreas, bazo, corazón, cerebro y vesículas seminales. La actividad sérica de esta enzima se encuentra elevada especialmente en colestasis, enfermedades hepáticas, biliares y pancreáticas. Su incremento en enfermedades hepatobiliares es en forma más precoz que el de FAL y 5' nucleotidasa. También aumenta en casos de inducción de la actividad del citocromo P-450 por alcohol o drogas.

Como valor clínico, la determinación de  $\gamma$ GT es útil ante un aumento de la FAL. Un aumento de la  $\gamma$ GT o de 5' nucleotidasa sugiere el origen hepático de una FAL elevada, ya que la  $\gamma$ GT no se modifica en pacientes con enfermedad ósea. (Ver determinación de FAL en Actividad Práctica).

### **5'NUCLEOTIDASA**

Es una hidrolasa que se encuentra en hígado, asociada a las membranas plasmáticas sinusoidales y canaliculares. Su presencia en suero indica acción de sales biliares sobre membranas plasmáticas. Alcanza valores elevados, al igual que  $\gamma$ GT, en obstrucciones intra- y extrahepáticas y lesiones infiltrativas del hígado. Se observan valores moderadamente elevados en lesiones hepatocelulares y nulos en hepatopatías por drogas. En pediatría y durante el embarazo resulta muy útil para remplazar el uso de FAL.

**- Determinación de 5' Nucleotidasa por método colorimétrico:****FUNDAMENTO**

La 5'nucleotidasa (5'-ribonucleotidofosfohidrolasa) cataliza la desfosforilación de fosfonucleósidos con grupos fosfatos en posición C5 del anillo de ribosa, tal como el AMP (adenosina 5' monofosfato) con máxima actividad a pH = 7,5. A este pH, el AMP también es hidrolizado inespecíficamente por las fosfatasas alcalinas (FAL) presentes en la muestra, según:



La 5' Nucleotidasa es inhibida selectivamente por iones  $\text{Ni}^{++}$ . La diferencia de medida entre el fosfato (Pi) liberado en presencia y en ausencia de  $\text{Ni}^{++}$  (determinado por la reacción colorimétrica de Fosfatemia), es proporcional a la actividad de la 5' nucleotidasa.

VALORES DE REFERENCIA: hasta 15 UI/L.

**- Utilidad de la determinación de colinesterasa (CHE)**

Se denomina colinesterasa a las esterasa que producen la hidrólisis de la acetilcolina. Se conoce:

1- La colinesterasa verdadera, eritrocitaria o específica o tipo I. Se encuentra unida a las membranas de las neuronas, en las sinapsis ganglionares de la estructura neuromuscular del organismo y en los eritrocitos.

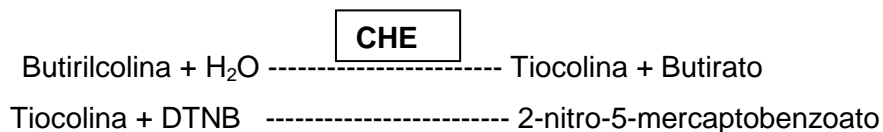
2- La colinesterasa sérica o pseudocolinesterasa o tipo II o butirilcolinesterasa (CHS). Está presente generalmente en forma soluble en casi todos los tejidos (principalmente hígado) y en plasma, pero en poca concentración en el sistema nervioso central y periférico, riñón, intestino y páncreas. Su síntesis puede ser inhibida por compuestos organofosforados. La CHS disminuye en hepatopatías crónicas, especialmente si evolucionan a cirrosis.

La diferencia entre los dos tipos de colinesterasa radica en sus respectivos sustratos: la de tipo I hidroliza acetilcolina más rápido y la de tipo II hidroliza butirilcolina más rápido.

**- Determinación de colinesterasa por método cinético****FUNDAMENTO**

La colinesterasa sérica o plasmática cataliza la hidrólisis de los ésteres de colina, tal como la 5-butiltiocolina con actividad máxima a pH 7,7. La tiocolina liberada reacciona con

el ácido 5-5'ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) produciendo un compuesto color amarillo de acuerdo a la siguiente reacción:



La velocidad de aparición de color es proporcional a la actividad enzimática. Medir a 405 nm.

VALORES DE REFERENCIA = (UI/L)

	25°C	30°C	37°C
UI/L	3.200	3.962	4.970
	9000	11.142	13.977

## PANCREAS EXOCRINO

### ENZIMOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES DEL PANCREAS

#### INTRODUCCIÓN

El páncreas es un órgano que reúne funciones secretoras endocrinas y exocrinas. Las secreciones exocrinas del páncreas son importantes en la digestión. El jugo pancreático consta de un componente acuoso, rico en bicarbonato, que ayuda a neutralizar el contenido duodenal y un componente enzimático, que interviene para la digestión de carbohidratos, proteínas y grasas. La secreción exocrina del páncreas está controlada por señales nerviosas y hormonales, originadas sobre todo por la presencia de ácido y productos de digestión en el duodeno.

Si bien el páncreas tiene un alto contenido de enzimas, se encuentran almacenadas principalmente en forma inactiva o zimógenos, por lo que son pocas las enzimas que pueden ser valoradas con fines de diagnósticos. El jugo pancreático contiene  $\alpha$ -amilasa, que es secretada en forma activa y además diversas enzimas para la digestión de lípidos, llamadas lipasas. Entre las principales lipasas pancreáticas se destacan: la triaglicerol hidrolasa, colesterol éster hidrolasa y fosfolipasa A2.

**Pruebas para la detección de trastornos pancreáticos:**

La determinación de la actividad amilasa y lipasa en los líquidos corporales ha representado durante años la principal forma de diagnóstico de pancreatitis aguda y pancreatitis recidivante crónica, en las que existe un aumento en la liberación de dichas enzimas en sangre y orina.

Existen procesos predisponentes que pueden ser evaluados; el alcoholismo o la insuficiencia biliar se encuentran en más del 80% de los pacientes con pancreatitis, con lo cual las pruebas bioquímicas sensibles a las lesiones hepáticas, como la GOT y la  $\gamma$ GT pueden resultar de utilidad. En las personas alcohólicas la hipertrigliceridemia puede desencadenar una pancreatitis y por consiguiente las determinaciones de triglicéridos séricos pueden también resultar útiles. Además, se indica realizar determinaciones de calcemia. El carcinoma pancreático constituye una importante causa de muerte para la que no existe aún un marcador eficaz para el diagnóstico precoz.

**I- AMILASA**

Las amilasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de aminopeptina, amilosa, glucógeno y sus productos parcialmente hidrolizados. La  $\alpha$ -amilasa se produce en tejidos y líquidos animales, escinde las uniones  $\alpha$ -1-4 glucosídicas de los polisacáridos que contienen tres o más unidades de D-glucosa unidas mediante enlaces  $\alpha$ -1-4. Con la hidrólisis por la  $\alpha$ -amilasa, la amilasa da lugar a un aumento de una mezcla de maltosa y glucosa, mientras que la amilopeptina produce una mezcla de oligosacáridos ramificados y no ramificados. La  $\alpha$ -amilasa disminuye rápidamente la capacidad de la amilasa y el almidón para teñirse de azul con el yodo y disminuye la viscosidad de las soluciones de almidón. Es una molécula pequeña PM 4500 Dalton por ello se filtra por riñón y en orina se halla más tiempo aumentada que en suero.

(Ver determinación de FAL en Actividad Práctica).

**II- LIPASA**

Las lipasas son enzimas muy lábiles al calor y el pH ácido, y su acción se lleva a cabo por medio de la hidrólisis de los enlaces éster, junto con los ácidos grasos. Estas enzimas actúan mejor en pH entre 7 y 9 y temperaturas entre 37 y 39 °C y su actividad depende de la absorción sobre partículas micelares. Aumenta como amilasa y permanece aumentada por más tiempo (7-10 días), es más específica. Se encuentra elevada en cirrosis sin pancreatitis y en administración de opiáceos y colinérgicos.

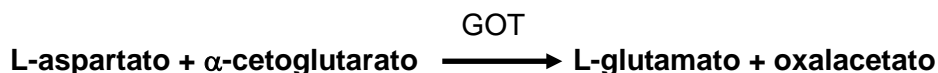
(Ver determinación de FAL en Actividad Práctica).

## ACTIVIDAD PRÁCTICA

### 1.- DETERMINACIÓN DE TRANSAMINASAS (Método Enzimático)

#### FUNDAMENTO

La GOT (ALT) cataliza la siguiente reacción:



La GPT (AST) cataliza la siguiente reacción:



Debido a que el oxalacetato es inestable y se transforma en piruvato, éste reacciona con la 2,4-dinitrofenilhidrazina, produciendo en medio alcalino, un compuesto coloreado que se mide a 505 nm.

#### REACTIVOS

- Sol. 100 mM de L-aspartato y 2 mM de  $\alpha$ -cetoglutarato en buffer fosfatos 100 mM, pH 7,4
- Sol. 200 mM de DL-alanina y 2 mM de  $\alpha$ -cetoglutarato en buffer fosfatos 100 mM, pH 7,4
- Sol. 1 mmol de 2,4-dinitrofenilhidracina (2,4-DNFH) en ácido clorhídrico 1 mol/l.
- Solución de hidróxido de sodio 4 mol/L.
- Estándar: solución de piruvato de sodio 2 mmol/L. Para efectuar la curva de calibración.

#### MUESTRA

- **Suero**

Sustancias interferentes: los sueros hemolizados producen resultados falsamente elevados ya que los glóbulos rojos contienen 3 a 5 veces más enzimas que el suero.

#### PROCEDIMIENTO

En dos tubos marcados B (Blanco) y D (Desconocido), colocar: (seguir las instrucciones del fabricante):



	<b>B (blanco)</b>	<b>D (Desconocido)</b>
<b>Reactivo A (GOT o GPT)</b>	0,5 mL	0,5 mL

Colocar en baño de agua a 37 °C ± 0,5 °C unos minutos.

<b>Suero</b>	---	100 µL
<b>Agua destilada</b>	100 µL	---

Mezclar por agitación suave e incubar exactamente 30 minutos y agregar:

<b>Reactivo B</b>	0,5 mL	0,5 mL
-------------------	--------	--------

Mezclar. Dejar 10 minutos a 37 °C. Luego agregar:

<b>Reactivo C</b>	5 mL	5 mL
-------------------	------	------

Mezclar por inversión y retirar del baño. Después de 2 minutos leer en espectrofotómetro a 505 nm, llevando el aparato a cero DO con agua destilada. El color de la reacción es estable durante 30 min.

## CÁLCULOS

Se debe restar a las lecturas de los tubos D (GPT) y D (GOT) el valor de la absorbancia de sus respectivos blancos. Así se obtienen las lecturas corregidas, que llevadas a la curva de calibración permiten obtener directamente el resultado en UI/L, ya que la reacción no sigue la Ley de Lambert y Beer.

Como el sistema de medida Reitman-Frankel (U/mL) no cumple dicha ley, es imposible utilizar el método del factor para cálculo, siendo necesaria la preparación de curva de calibración (seguir las instrucciones del fabricante). Luego, delinear la curva correlacionando las lecturas obtenidas con los valores en UI/mL.

Se puede emplear tablas de conversión: este cálculo se basa en la absortividad del cromógeno y los valores de actividad enzimática pueden deducirse de las tablas de conversión obtenidas por comparación con el método UV convencional, siempre que las lecturas se efectúen en las condiciones de medida establecidas previamente.

## VALORES DE REFERENCIA

Se consideran valores normales de transaminasas (GOT y GPT) hasta 12 U/L.

## 2.- DETERMINACIÓN DE BILIRRUBINA (Método colorimétrico)

### FUNDAMENTO

La bilirrubina (bili) reacciona específicamente con el ácido sulfanílico diazotado produciendo un pigmento color rojo-violáceo (azobilirrubina) que se mide en espectrofotómetro a 530 nm. La bilirrubina directa (conjugada) reacciona con el diazorreactivo mientras que la indirecta (no conjugada) requiere la presencia de un desarrollador acuoso que posibilite su reacción. De esta forma, para determinar la bilirrubina Total (conjugada + no conjugada) presente en la muestra debe agregarse benzoato de cafeína al medio de reacción.

### CURVA DE CALIBRACIÓN DE BILIRRUBINA

- **Testigo:** 500 µg de bilirrubina pura. Agregar al frasco 5 mL de agua destilada. Tapar y mezclar varias veces durante 30 min hasta disolución completa.

### REACTIVOS

- Reactivo **A:** solución acuosa de benzoato de cafeína 0,13 mol/L, tamponada y estabilizada.
- Reactivo **B:** solución de ácido sulfanílico 29 mmol/L y ácido clorhídrico 0,17 mol/L.
- Reactivo **C:** solución de nitrito de sodio 0,07 mol/L.

### TÉCNICA

En 6 tubos marcados 1, B1, 2, B2, 3, B3 colocar:

Tubo	Sol. Testigo (µL)	Reactivo A (mL)	Agua	Diazorreactivo (mL)	Reactivo B (mL)	Concentración (mg/L)
1	50	2,6	---	0,2	---	25
B1	50	---	2,6	---	0,2	---
2	100	2,6	---	0,2	---	50
B2	100	---	2,6	---	0,2	---
3	200	2,5	---	0,2	---	100
B3	2000	---	2,5	---	0,2	---

Incubar 5 min. Leer en espectrofotómetro a 530 nm (reacción estable por 15 min).

### CÁLCULOS

Registrar las lecturas. Restar a las lecturas de los tubos 1, 2 y 3 los blancos respectivos, obteniendo de esta manera las "lecturas corregidas". Con estos valores construir un gráfico colocando en el eje vertical los valores de lecturas corregidas y en el eje

horizontal las concentraciones de bilirrubina en mg/L. La reacción sigue la Ley de Beer, lo que permite calcular un factor colorimétrico para cada tubo:

$$F \text{ (factor)} = \frac{\text{Bilirrubina (mg/L)}}{\text{Lectura corregida}}$$

### - Determinación de Bilirrubina directa y total

#### TÉCNICA

	B (blanco)	D (bili directa)	T (bili total)
Suero	200 µL	200 µL	200 µL
Agua dest.	2,5 mL	2,5 mL	---
Reactivo A	---	---	2,5 mL
Reactivo B	200 µL	---	---
Diazorreactivo	---	200 µL	200 µL

#### PROCEDIMIENTO

Una vez que se han adicionado los reactivos en los tubos correspondientes, se mezcla inmediatamente cada uno de ellos por inversión. Luego de 5 min leer a 530 nm en espectrofotómetro (520-550nm) llevando el aparato a cero con agua destilada.

Las lecturas pueden efectuarse entre los 4 y 15 min. La **bilirrubina Directa debe leerse a los 5 minutos exactos**, porque en ese tiempo los valores se corresponden con los de las determinaciones efectuadas por el método de partición en tres solventes. Si se realiza la lectura antes habrá subvaloración de los resultados por reacción incompleta. Si se lee después habrá sobrevaloración, ya que comienza a reaccionar la bilirrubina libre.

Para ictericia moderada se usará 50 µL de suero mientras que para una ictericia intensa se requieren 20 µL. Multiplicar los resultados obtenidos por los factores respectivos.

#### CALCULOS

$$\text{Bilirrubina total (mg/L)} = (T - B) \times F \text{ (factor)}$$

$$\text{Bilirrubina directa (mg/L)} = (D - B) \times F$$

$$\text{Bilirrubina libre (indirecta)} = \text{BRB total} - \text{BRB directa}$$

El factor (F) se calcula de la curva de calibración realizada previamente.

#### VALORES DE REFERENCIA

En adultos: Bili Directa: hasta 2 mg/L

Bili Total: hasta 10 mg/L

### 3.- DETERMINACIÓN DE FOSFATASA ALCALINA (optimizada)

#### FUNDAMENTO

La fosfatasa alcalina (FAL) desdobra al fenilfosfato de sodio en medio alcalino tamponado con aminometil propanol (AMP). El fenol liberado se determina por reacción con 4-amino-amino-antipirina y ferrocianuro como agente oxidante. El color desarrollado es directamente proporcional a la actividad enzimática y se mide a 520 nm.

#### MATERIALES

- Espectrofotometro o fotocolorímetro
- Micropipetas y pipetas para medir los volúmenes indicados.
- Tubos de ensayo, probetas
- Baño de agua a 37°C, reloj o timer

#### REACTIVOS

- Buffer: 4-aminoantipirina 29 mmol/L en sol. aminometil propanol 3 mol/L pH 10 (a 37 °C)
- Na FF: fenilfosfato de sodio, 1,4 mmoles
- Reactivo de color: ferricianuro de potasio, 10 mmol/L
- Estandar: solución de fenol equivalente a 200 UI/L

#### Nota:

- Transferir el contenido del frasco de NaFF al frasco de buffer y disolver (concentración final 14 mM).
- Reactivo de color: Disolver el contenido del envase en 500 mL de agua destilada. Rotular y colocar la fecha de preparación. Estable durante 5 meses a temperatura ambiente y al abrigo de la luz.

#### MUESTRA: Suero

#### TÉCNICA

En 3 tubos marcados B (Blanco), D (Desconocido) y S (Estándar) a 37 °C, medir:

	<b>B</b>	<b>S</b>	<b>D</b>
<b>Sustrato</b>	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL

Preincubar en baño de agua a 37 °C unos minutos. Luego agregar:

<b>Suero</b>	---	---	50 µL
<b>Estandar</b>	---	50 µL	---

Mezclar, incubar exactamente 10 min (cronómetro) y agregar:

<b>Reactivo de color</b>	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
--------------------------	--------	--------	--------

Mezclar de inmediato cada tubo. Retirar los tubos del baño y leer en espectrofotómetro a 520, llevando el aparato a cero de absorbancia con agua destilada. El color de reacción es estable durante 30 min.

**CÁLCULOS**

Fosfatasa alcalina (UI/L)= factor x (D-B)

Factor:  $\frac{200 \text{ UI/L}}{(S-B)}$

**VALORES DE REFERENCIA**

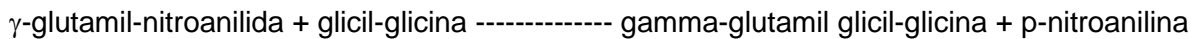
Adultos: 68-240 UI/L

Niños: 100-400 UI/L

**4) GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA (γGT)**

**FUNDAMENTO (Método cinético)**

La γGT cataliza la transferencia del grupo gamma-glutamilo desde la gamma-glutamyl p-nitroanilida (sustrato) a una molécula de glicil-glicina (aceptor) liberando p-nitroanilina en cantidades equimolares según la reacción:



En las condiciones de reacción la cantidad de p-nitroanilina es directamente proporcional a la actividad de γGT en suero. Por lo tanto, la actividad puede medirse de dos maneras:

Se lee la aparición del color amarillo de la p-nitroanilina a 405 nm.

- Sustrato reconstituido: 3 mL.
- Muestra 200 μL.
- Mezclar. Ajustar la absorbancia a un valor de referencia (0,2 ó 0,3 DO) disparar el cronómetro.
- Registrar la absorbancia a los 1, 2, 3 min. Sacar el ΔT. Promediar ΔA /min.

**CÁLCULOS**

$\gamma\text{GT (UI/L)} = \Delta A / \text{min} \times 1616$

**VALORES DE REFERENCIA = (UI/L)**

	<b>25°C</b>	<b>30°C</b>	<b>37°C</b>
Hombre	6-28	8-37	12.5-54
Mujer	4-18	5-24	5-34

Valores de Referencia en diversas patologías (U/L)

<b>PATOLOGÍA</b>	<b>AUMENTO (N° de veces /limite de referencia sup.)</b>
1- Cirrosis Hepática	1,5-15
2- Hepatitis Aguda	2-20
3- Hepatitis Crónica	3-20
4- Hígado Graso	hasta 10
5- Obstrucción extra hepática con ictericia	1,5-20
6- Metástasis hepática	hasta 40
7- Alcoholismo crónico	1,5-10
8- Obstrucción extra hepática s/ictericia	hasta 20

## 5- DETERMINACIÓN DE AMILASA

### ➤ Método Amiloblástico Yodométrico (del sustrato)

#### FUNDAMENTO

El almidón tamponado se incubaba con la muestra produciéndose la hidrólisis enzimática. Esta se detiene por el agregado del reactivo de yodo que al mismo tiempo produce color con el remanente de almidón no hidrolizado. La disminución de color respecto de un sustrato control (sin muestra) es la medida de la actividad enzimática que se expresa en unidades amilolíticas/dL comparables con las unidades sacarogénicas/dL.

#### REACTIVOS

- Reactivo A: sol. almidón 500 mg/L a pH 7 con buffer fosfatos 0,1 mol/L en ClNa 0,15 mol/L.
- Reactivo B: solución 0,01 Eq/L de yodo en ácido clorhídrico 0,02 mol/L.

#### TÉCNICA

En dos tubos marcados C (control) y D (desconocido) agregar:

	<b>C</b>	<b>D</b>
<b>Reactivo A</b>	1 mL	1 mL

Colocar a Baño María a 37°C unos min y agregar:

<b>Muestra</b>	---	20 µL
----------------	-----	-------

Incubar y a los 7,5 min. Exactos agregar:

<b>Reactivo B (yodo)</b>	1 mL	1 mL
--------------------------	------	------

Mezclar suavemente, retirar del baño y agregar:

<b>Agua destilada</b>	8 mL	8 mL
-----------------------	------	------

Mezclar y leer a 640 nm llevando a cero con agua destilada

## CÁLCULOS

$$\text{Amilasa UA/dL} = \frac{C - D}{C} \times 1000$$

**Unidades:** Una unidad amilolítica es la cantidad de enzima contenida en 100 mL de muestra que puede hidrolizar 10 mg de almidón en 30 min en las condiciones de reacción. En esta técnica se incuban 20 µL de muestra con 0,5 mg de almidón contenidos en 1 mL de sustrato durante 7,5 min lo que equivale a incubar 100 mL de suero con 10.000 mg de almidón durante 30 min. Si todo el almidón fuera hidrolizado la actividad amilásica de la muestra sería de 1.00 UA/dL. Para obtener las unidades de actividad amilásica la fracción del almidón digerido se multiplica por 1.000.

## VALORES DE REFERENCIA

Normal en Suero	60-120 UA/dL	Normal en orina	30-260 UA/dL
Pancreatitis aguda	300-12.000		> 900
Pancreatitis crónica	Hasta 200		> 300
Parotiditis			
Parotiditis con comp. pancreático	200-350		350-750
Procesos de abdomen agudo sin pancreatitis.	Más de 350		> 7560

Valores elevados se observan en:

- Hipertiroidismo.
- Obstrucción intestinal
- Carcinoma de cabeza de páncreas
- Administración de opiáceos y clorotiazina.

Valores disminuidos se observan en:

- Cirrosis
- Abscesos o carcinoma de hígado
- Hepatitis severas
- Toxemia del embarazo
- Alcoholismo agudo.

## Determinación de amilasa en orina

### Toma de muestra

El paciente debe orinar, descartando esta micción, dos horas después volver a orinar y recoger toda la orina. Esta muestra corresponde a una diuresis de 2 h y se diluye a 200 mL de agua destilada. La determinación se efectúa con 20 µL de la dilución, obteniéndose el resultado en UA/h. Debido a las grandes variaciones de las diuresis en los cuadros agudos

comparables con diagnóstico de pancreatitis, la valoración de amilasuria sobre muestras simples de orina, carece de valor por lo que debe determinarse la excreción horaria.

## 6- DETERMINACIÓN DE LIPASA

### ➤ Método Turbidimétrico cinético U.V

#### FUNDAMENTO

La lipasa pancreática (triacilglicerol-acilhidrolasa) cataliza la hidrólisis de la trioleína:



Se utiliza como sustrato una emulsión de trioleína estabilizada con sales biliares y de co-lipasa como activador de la velocidad de hidrólisis de la trioleína a pH = 9. Se determina la disminución de turbidez en la emulsión a 340nm.

#### VALORES DE REFERENCIA

Hasta 200 UI/L a 25-30 °C

## RESOLUCIÓN DE CASOS CLÍNICOS

### Caso 1

Mujer de 39 años de edad, diabética tipo II, sin intervenciones quirúrgicas ni transfusiones previas, que es remitida al hepatólogo para estudio de hipertransaminasemia discreta de un año de evolución. Fue detectada inicialmente en análisis rutinarios para control de su diabetes, manteniéndose en los controles posteriores. Consumía alcohol sólo de forma esporádica y no tomaba fármaco habitualmente. La exploración física halló sobrepeso (talla de 1,57 cm y un peso de 70 Kg), sin apreciar estigmas de hepatopatía crónica. Sólo destacó ligera hepatomegalia no dolorosa, lisa y de consistencia firme.

#### Resultados de Laboratorio (Primera determinación analítica):

Hemograma: dentro de los valores de referencia. Glucemia Basal: 190 mg/dL (VR: 70-110). Transaminasas: GOT: 130 U/L; GPT: 200 U/L; γGT: 86 U/L; FAL: 340 U/L; Bilirrubina sérica: Normal; Triglicéridos: aumentados; Colesterol: Normal; Proteinograma: Normal. Ferritina, Sideremia y Transferrina: Normal

Se le indicó a la paciente la pérdida ponderal, para evaluar su efecto en una segunda determinación analítica.



**Datos de Laboratorio** (Segunda determinación analítica)

Transaminasas: mantuvieron el valor del primer control. Serología para virus de hepatitis B y C: Negativa. Determinación de ANA, ASMA, y anti-LKM: Negativos

**1- Discusión del Caso:**

**A)** ¿Qué diagnóstico diferencial podría plantear al momento de los primeros resultados de laboratorio?

- |                         |                             |
|-------------------------|-----------------------------|
| a) Hepatitis autoinmune | b) Hepatitis crónica vírica |
| c) Esteatosis hepática  | d) Esteatohepatitis         |
| e) Todas las anteriores |                             |

**B)** ¿Cuál sería el diagnóstico posible luego de analizar los resultados de laboratorio de la segunda determinación analítica?

**C)** ¿Qué prueba diagnóstica considera que solicitaría el médico ante la sospecha de esteatosis hepática, teniendo en cuenta costos, complejidad y grado de invasión de las mismas?

- |                              |                        |
|------------------------------|------------------------|
| a) Biopsia hepática          | b) Ecografía abdominal |
| c) TAC de abdomen            | d) RMN                 |
| e) Colangiografía endovenosa |                        |

**Caso 2**

Paciente mujer de 38 años, ingresa a urgencias con cuadro de dolor abdominal en epigastrio y mesogastrio, de 12 h de evolución irradiado a espalda, acompañado de emesis biliar, malestar general y disnea, sin fiebre. Antecedentes: diagnóstico reciente de hipotiroidismo sin tratamiento. Se realizan exámenes iniciales que reportan: hematocrito: 44,3%; leucocitos: aumentados. Ionograma: Na<sup>+</sup>: 124 mEq/L; K<sup>+</sup>: 3,37 meq/L; Cl<sup>-</sup>: 100 mEq/L; Calcio: 8,6 (VR: 8,10-10,40); creatinina: 0,58 mg/dL; BUN: 7,4; glucemia: 130 mg/dL; amilasa: 537 U/dL; colesterol total: 1.029 mg/dL; triglicéridos: 7.508 mg/dl; lipasa: 6.660 U/l. Gases arteriales: pH: 7,33; PO<sub>2</sub>: 77%; PCO<sub>2</sub>: 26; HCO<sub>3</sub>: 13; EB: -10. Pruebas de coagulación normales. Suero lipémico. Ecografía abdominal: aumento de ecogenicidad periportal, páncreas aumentado de tamaño y aumento difuso de su ecogenicidad, presencia de líquido peripancreático, no litiasis. Se realiza el diagnóstico y se inicia tratamiento con insulina (2 U/h).

- 1) ¿Cuál es el diagnóstico probable?
- 2) ¿Cuál es la etiología de la patología que sugirió?
- 3) Describa la Fisiopatología de la enfermedad.
- 4) ¿Por qué la insulina es una de las opciones terapéuticas en estos pacientes?

### Caso 3

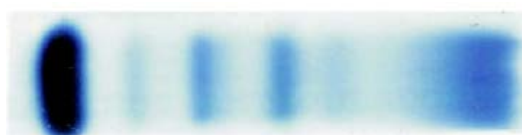
Mujer de 39 años que acude al Servicio de Urgencias con embarazo de 30.2 semanas de gestación, refiriendo prurito generalizado, de predominio en manos y pies, el cual le impedía conciliar el sueño. A la exploración física, presentaba discreta ictericia como único hallazgo. Laboratorio: BT: 1,3 mg/dL; GOT: 349 U/L; GPT: 184 U/L; FAL: 217 U/L; ácidos biliares séricos: 25 uMol/L (VR:  $\leq 6$ ), Tiempo de Protrombina: 97%; plaquetas: 220.000/mm<sup>3</sup>. La ecografía abdominal fue normal. Se descartaron diagnósticos diferenciales, iniciándose terapia con ácido ursodesoxicólico (UDCA, 20 mg/kg/día).

- 1) Analizar los datos de laboratorio. ¿Cuál es el diagnóstico probable?
- 2) ¿Con qué otras patologías gastrointestinales debería realizarse el diagnóstico diferencial?
- 3) ¿Por qué el UDCA es una de las opciones terapéuticas en estos pacientes?

### Caso 4

Niña de 6 años, que consulta por decaimiento general, astenia, y leve malestar abdominal. Laboratorio: GB: 6.900/mm<sup>3</sup>, Hb: 12,60 g/dL, VSG: 30 mm/h la primer hora, ferremia: 232 ug/dL (VR: 55-140), capacidad de saturación del hierro: 540 ug/dL (VR: 274-494), grado de saturación: 43% (VR: 20-50), glucosa: 0,62 (VR: 0,70-1,26), urea: 0,20 g/L (VR: 0,15-0,40), GOT: 1.512 U/L, GPT: 1.320 U/L; calcio: 10 mg % (VR: 8,10-10,40), FAL: 1.203 U/L; BD: 1,35 mg%, BT: 2,18 mg%, BI: 0,83 mg%, Tiempo de Protrombina: 58%;  $\gamma$ GT: 166 U/L. La ecografía de abdomen muestra al hígado con su estructura conservada, sin dilatación del árbol biliar.

- 1) ¿Qué parámetros de laboratorio permitirían descartar el origen viral de la afección?
- 2) Si los parámetros propuestos en a) resultasen negativos, ¿qué otras determinaciones se deberían realizar para aproximarse a un diagnóstico?
- 3) En base a lo observado y ante la sospecha clínica se solicitan las siguientes determinaciones:
  - ANA: Positivo 1/1.280 (IFI, patente homogénea, sustrato: línea celular Hep2)
  - ASMA: Positivo: título 1/320 (IFI, sustrato: estómago de rata)
  - Ac. Anti-Actina: Positivo 1/80 (IFI)
  - LKM: Negativo (IFI, sustrato: combinado de hígado y riñón de rata)
  - Alfa 1 antitripsina (turbidimetría): 153 mg/dL (VR: 83-199 mg/DI)
  - Proteinograma electroforético (suero):



- 4) En función de los resultados obtenidos, sugiera el diagnóstico más probable para la paciente. Describa su fisiopatología.

## BIBLIOGRAFÍA

- MEDICINA DE LABORATORIO. FUNDAMENTOS Y APLICACIONES EN EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO. I Antonozzi y E Gulletta. 1ª Edición. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires 2015.
- HARRISON PRINCIPIOS DE MEDICINA INTERNA. DL Longo, AS Fauci, DL Kasper, SL Hauser, JL Jameson, J Loscolzo J. 18ª Edición. Ed. Mc. Graw Hill, España 2012.
- EL LABORATORIO EN EL DIAGNOSTICO CLINICO. JB HENRY. 20ª Edición. Ed. Marbán, España 2010.
- FISIOPATOLOGÍA. SALUD-ENFERMEDAD: UN ENFOQUE CONCEPTUAL. CM Porth. 7ª Edición. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires 2006.
- TIETZ TEXTBOOK OF CLINICAL CHEMISTRY AND MOLECULAR DIAGNOSTICS. C Burtis, E Ashwood y D Bruns. 4ª Edición. Ed. Saunders Elsevier, México 2006.

## TRABAJO PRÁCTICO N° 9

### MARCADORES CARDIACOS EN EL DIAGNÓSTICO Y MONITOREO DEL INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO



#### OBJETIVOS

- Comprender los cambios bioquímicos en el infarto agudo de miocardio (IAM)
- Determinar las enzimas cardíacas. Interpretación de resultados en un IAM.

#### INTRODUCCIÓN

El síndrome coronario agudo hace referencia a un conjunto de síntomas clínicos originados por una isquemia miocárdica. Puede abarcar desde una fase potencialmente reversible (angina inestable) hasta la muerte celular irreversible (infarto agudo de miocardio y muerte súbita).

Se define al **Infarto Agudo de Miocardio (IAM)** como la necrosis resultante de una interrupción aguda del aporte sanguíneo en un área determinada del miocardio. En general, es causada por aterosclerosis de una o más arterias coronarias, que provoca la disminución de la luz arterial con la consecuente aparición de isquemia miocárdica. La mayor parte de los IAM involucran trombosis en el sitio de una placa ateromatosa (Figura 1). Si bien no es frecuente, puede producirse una isquemia en ausencia de aterosclerosis oclusiva (espasmo coronario como angina de Prinzmetal, abuso de cocaína, o inflamación de la arteria coronaria asociado a enfermedad de Kawasaki).

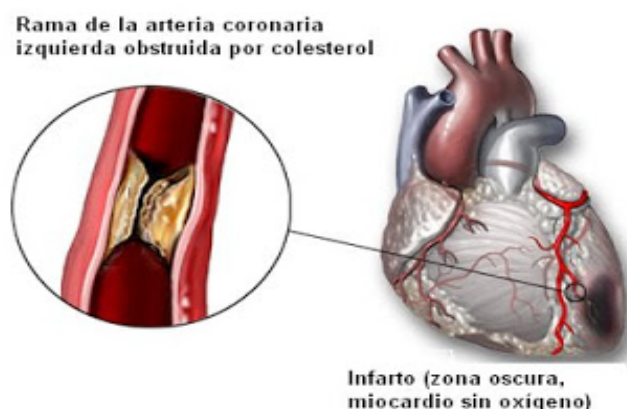


Figura 1. Infarto agudo de miocardio (<http://cardiosaudeferrol.com>)

Los factores de riesgo de coronariopatías incluyen: obesidad, tabaquismo, hipertensión arterial no controlada, dislipemia y diabetes mellitus, estrés, antecedentes familiares, entre otros. Se ha demostrado que existe una mayor incidencia de IAM en horas de la mañana. Esto se atribuye a que se acentúan un conjunto de factores bioquímicos y fisiológicos, que presentan ritmo circadiano, tales como el aumento de las catecolaminas plasmáticas con la consiguiente elevación de la actividad adrenérgica, el incremento de los niveles de fibrinógeno, el aumento de la adhesividad plaquetaria y la baja actividad del activador del plasminógeno tisular.

El IAM se caracteriza por la aparición de dolor torácico intenso (*angina pectoris*) que puede irradiar hacia el brazo izquierdo o ambos, también cuello y espalda, asociado a veces con náuseas, diaforesis (sudoración profusa) y disnea. Son frecuentes las presentaciones atípicas (dolor epigástrico, dolor en la parte superior de la espalda o mareos) en pacientes jóvenes, ancianos y mujeres. La isquemia asintomática miocárdica (isquemia silenciosa) es particularmente frecuente en diabéticos.

### **Cambios bioquímicos en el IAM**

El cese del flujo sanguíneo debido al IAM produce una serie de consecuencias complejas. Se observa en los primeros 30 minutos, cambios ultraestructurales en el músculo cardíaco asociados a una reducción del número y tamaño de los gránulos de glucógeno, edema intracelular con hinchamiento y distorsión del sistema tubular transversal, retículo sarcoplásmico y mitocondrias. Estas alteraciones tempranas son reversibles si el tejido se reperfunde (Figura 2).

En condiciones fisiológicas, las células miocárdicas (cardiomiocitos) utilizan como fuente de energía la síntesis de ATP que proviene de la oxidación de ácidos grasos (vía ciclo de Krebs-fosforilación oxidativa), sin embargo en el IAM debido al déficit agudo de oxígeno se produce la caída abrupta de los niveles de ATP. En consecuencia, se produce la inhibición de la enzima de membrana ATPasa- $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  dependiente (bomba tres iones  $\text{Na}^+$  fuera del citosol por dos iones  $\text{K}^+$  que introduce), que induce un cambio en el potencial de membrana de -70 mV, provocando la entrada masiva de  $\text{Na}^+$  y agua, con producción de edema agudo celular. Esto conduce a la ruptura de la membrana y liberación del contenido de enzimas citosólicas y posterior necrosis celular.

La disminución de ATP pone en marcha como alternativa la vía glucolítica, que tiene menor rendimiento energético y crea un microambiente de acidosis láctica, ya que al estar impedido el flujo sanguíneo no puede entrar en la vía gluconeogénica. El pH generado se reduce de su valor fisiológico de 7,38 – 7,40 a valores tan bajos como 6,2 – 6,4 (Figura 2).

Si se produce la rápida intervención médica dentro de los 30 minutos se ha comprobado que el tejido miocárdico afectado sería potencialmente salvable, mediante la

administración de estreptokinasa o urokinasa que producen la lisis del coágulo o trombo responsable y la repermeabilización del tejido miocárdico afectado. En este contexto, cabe considerar la extensión del tejido lesionado y las condiciones bioquímico-clínicas generales del paciente. Sin embargo, si transcurre más de 60 minutos, los cambios antes mencionados comienzan a ser irreversibles, con alteración de la conductividad eléctrica que contribuye a la aparición de arritmias cardíacas, disrupción de la arquitectura miofibrilar, edema mitocondrial y necrosis celular.

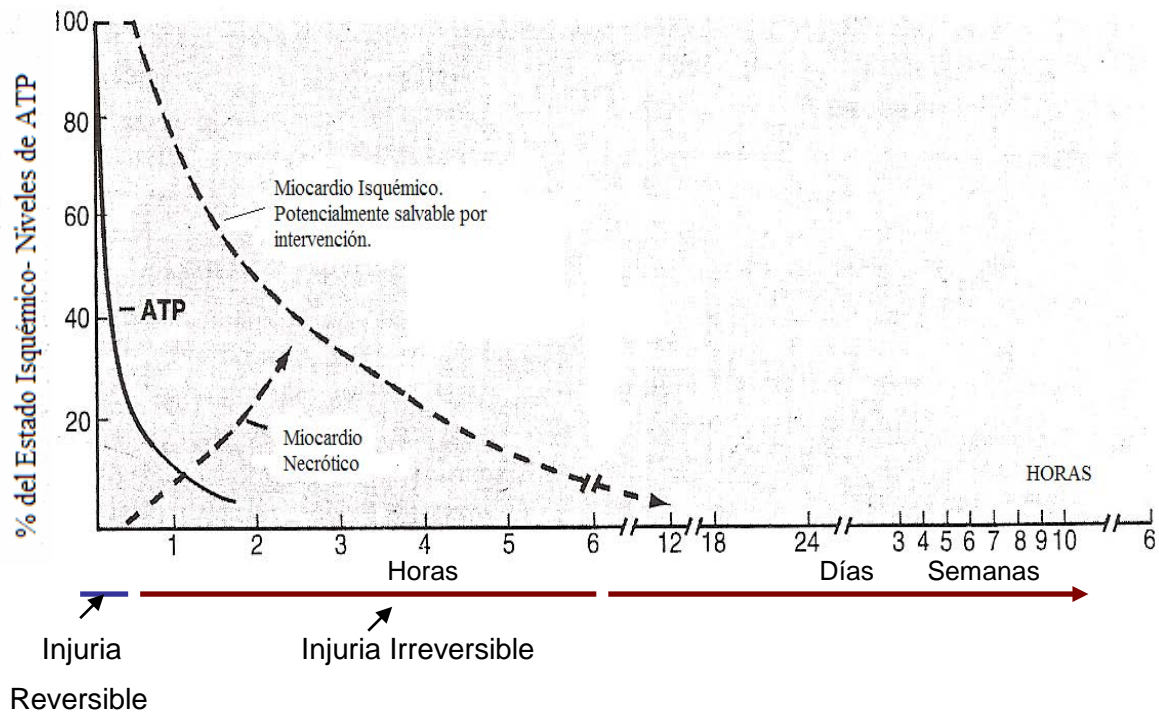


Figura 2. Secuencia temporal del infarto de miocardio. Relación de los niveles de ATP con necrosis del miocardio (<https://www.sac.org.ar>)

## MARCADORES CARDÍACOS

La necrosis de miocardio está acompañada por la liberación en el intersticio cardíaco de proteínas estructurales y otras macromoléculas intracelulares como consecuencia del compromiso de la integridad de las membranas celulares. Estos biomarcadores de necrosis de miocardio, algunos de ellos con actividad enzimática, incluyen a la **mioglobina (Myo)**, **creatininkinasa (CK)**, **lactato deshidrogenasa (LDH)**, **troponina cardíaca I y T (cTnI y cTnT)**, entre otras.

El diagnóstico de IAM, reciente o en evolución, requiere hallazgos de un aumento o disminución típicos de un biomarcador de necrosis, junto con alguna evidencia clínica (síntomas, electrocardiograma-ECG, estudios por imágenes) de que la causa de la lesión del miocardio es una isquemia. Si los valores de dichos marcadores están alterados, en un

contexto no isquémico, se deberá pensar en otros procesos que pueden producir daño miocárdico más o menos severo (insuficiencia cardíaca o renal, miocarditis, arritmias, embolia pulmonar o procedimientos quirúrgicos coronarios o percutáneos).

### **MIOGLOBINA (Myo)**

La mioglobina (Myo) es una molécula pequeña (PM 17.800 Da) de localización citoplasmática que une oxígeno presente en el músculo cardíaco y esquelético. Esta proteína de origen cardíaco puede ser liberada directamente al torrente circulatorio y ser detectada en plasma antes que otros marcadores, pudiendo medirse a la hora del inicio de los síntomas. Su permanencia en sangre depende del *clearance* renal, con un pico máximo de actividad entre las 6-9 h, regresando a valores basales a las 18-24 h. Su determinación cuantitativa se correlaciona con la extensión del infarto y puede ser utilizada para la detección de recidivas (Figura 3).

La Myo posee una alta sensibilidad diagnóstica (90-100%), pero una especificidad relativamente baja (60-90%) debido a la amplia distribución de esta proteína en otros tejidos musculares. Sus valores son más elevados en el hombre que en la mujer (por la diferencia de masa muscular), aumentando con la edad en ambos sexos (por la destrucción muscular). Otras situaciones que producen incremento de Myo son: insuficiencia renal, lesiones del músculo esquelético, choques eléctricos, cirugía, distrofias musculares, rabdomiólisis y ejercicio físico, especialmente en individuos no entrenados.

La utilidad principal de Myo como marcador está dada por su valor predictivo negativo. Si las concentraciones del mismo permanecen inalteradas y dentro de los valores de referencia en las primeras 3 a 6 h del comienzo de los síntomas, podemos tener la certeza del 100% de que la injuria muscular cardíaca no es de aparición reciente.

La Myo puede medirse en suero mediante técnicas radioisotópicas (radioinmunoensayo), aglutinación de partículas de látex (semicuantitativo), técnicas de ELISA con anticuerpos monoclonales, polarización de fluorescencia y quimioluminiscencia directa.

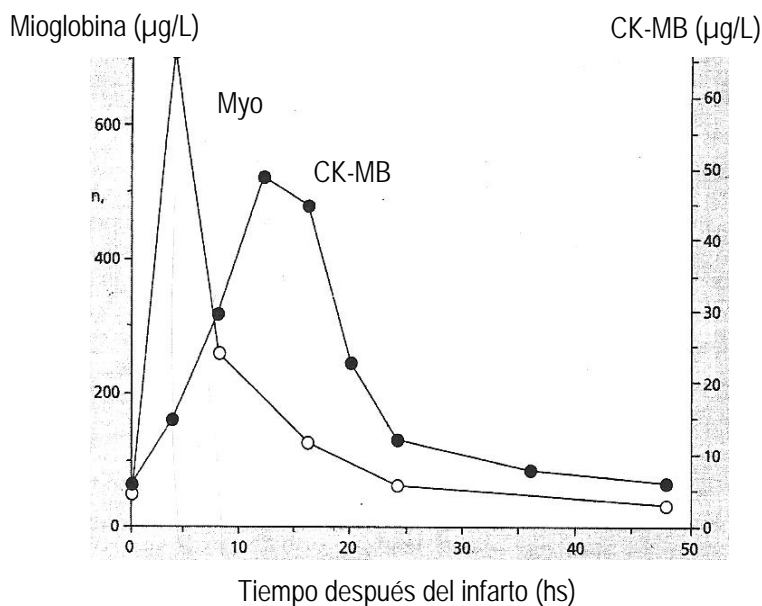


Figura 3. Patrón temporal en suero de Mioglobina (círculo abierto) y creatinina kinasa-2 (CK-MB) (Burtis C, Ashwood E, Bruns D. 2006).

### CREATINQUINASA (CK)

La CK es una enzima de localización citoplasmática que cataliza la transferencia de un fosfato de alta energía desde el fosfato de creatina (principal depósito de almacenamiento energético en el músculo en reposo) a la adenosina bifosfato produciendo trifosfato de adenosina para su empleo por los miocitos. Si bien se encuentran sus niveles elevados en el tejido muscular esquelético y cardíaco, también es posible detectarla en otros órganos. Esta enzima es un dímero (PM 40.000 Da) compuesto de dos subunidades, B (brain) y M (muscle), las cuales pueden asociarse para originar tres isoenzimas:

- **CK-BB (CK-1):** se ubica preferentemente en sistema nervioso central y tejidos como próstata, estómago e intestino, hígado, vejiga, útero y placenta.
- **CK-MB (CK-2):** se ha descrito que hasta el 20% del total de CK en el miocardio enfermo es CK-MB aunque esta proporción es menor en el miocardio sano.
- **CK-MM (CK-3):** se localiza en músculo esquelético (el 95% del total de CK en músculo es CK-MM).

Estas isoenzimas se encuentran en el citosol o asociadas con estructuras miofibrilares. A su vez, pueden separarse por su diferente movilidad electroforética, recibiendo el número menor aquella que tiene mayor desplazamiento hacia el ánodo. Existe una cuarta isoenzima: CK-mitocondrial, que difiere de las otras tanto inmunológicamente como por su movilidad electroforética.



- **CK-Total**

Hasta la aparición de otros marcadores, la CK-total había sido el marcador biológico más utilizado para el diagnóstico de las alteraciones miocárdicas y del músculo esquelético. En la necrosis miocárdica, la actividad catalítica de la CK ya puede detectarse aumentada por encima de su límite superior de referencia a partir de las 4-6 h del comienzo de los síntomas. Alcanza un máximo después de 18-24 h y retorna a sus valores normales entre el tercer y sexto día. La determinación de CK por el método cinético tiene una sensibilidad del 97% y una especificidad del 67%.

La CK-total no es una molécula cardio-específica y sus intervalos de referencia varían con la masa muscular, edad (disminuyen al aumentar la misma), raza (su actividad es más elevada en la raza negra) y actividad física (aumenta tras su práctica, en relación directa con su duración e intensidad, e inversa con el grado de entrenamiento previo). El incremento de la CK en plasma es inespecífico y suele ser un hallazgo común en el laboratorio. Las drogas de abuso (alcohol, cocaína) y numerosos fármacos (estatinas, corticoides, ciclosporina) provocan elevaciones de CK.

- **CK-MB**

Entre el 15% y el 20% de la CK del tejido cardíaco es CK-MB, siendo el miocardio el principal origen de esta isoenzima. La CK-MB aumenta a las 3 a 6 h tras el inicio de los síntomas de IAM y el máximo se alcanza entre las 12 y 24 h. Dado que la CK-MB tiene una vida sérica más corta que la CK-MM, el retorno a la normalidad se produce más rápido para la CK-MB (de 48 a 72 h) en relación a la CK-Total (de 72 a 96 h).

Ante un incremento del nivel de CK-MB, si el diagnóstico de isquemia miocárdica no está definido, es necesario considerar otras patologías que expliquen el origen músculo-esquelético de la isoenzima: traumatismos, enfermedades degenerativas e inflamatorias del músculo esquelético, hipotiroidismo, síndrome de Reye, etc. A su vez, la cirugía cardíaca, miocarditis, cateterización coronaria y angina de pecho también elevan los niveles séricos de la CK-MB.

Para diagnosticar un IAM es útil obtener el Índice de Corte o Índice Relativo, es decir el porcentaje de MB respecto de la CK total, el cual orienta acerca del origen orgánico de la elevación de CK-MB. Cuando el porcentaje de CK-MB se encuentra entre el 6 y el 20% del valor de la CK total, es indicativo de IAM; si el porcentaje es menor a 6% es probable que el daño derive del músculo esquelético, pero cuando supera el 20% se debe sospechar de la presencia de formas atípicas de CK. Estos valores se modifican levemente cuando se trabaja con valores de CK fracción MB masa (CK-MB masa).

**Índice de Corte o Índice Relativo:**

$$[(\text{CPK-MB} / \text{CPK Total}) \times 100]$$

**Método de inmunoinhibición**

*>6% origen miocárdico*

*<6% origen músculo esquelético*

En lugar de establecer el diagnóstico de IAM a partir de una sola determinación de CK Total y CK-MB, es conveniente que se efectúen una serie de mediciones en las primeras 24 h. La liberación de CK-MB por el músculo esquelético sigue habitualmente un patrón “en meseta”, mientras que el IAM se asocia a un incremento de la CK-MB, que alcanza su pico aproximadamente a las 20 h del comienzo de la obstrucción coronaria.

## MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE LA CK-MB

### a) Métodos no inmunológicos:

- Electroforesis: técnica semicuantitativa que conduce generalmente a una sobreestimación de la CK-MB. Es lenta y poco práctica, sobre todo en un Laboratorio de Urgencias.
- Cromatografía de intercambio iónico: no garantiza la separación absoluta de las isoenzimas MB y BB.

### b) Métodos inmunológicos:

- Inmunoinhibición (CK-MB actividad): este método es uno de los más utilizados en los laboratorios de baja y mediana complejidad. Se basa en la inhibición específica de las subunidades CK-M con anticuerpos monoclonales anti CK-M. Los Ac inhiben tanto la isoenzima MM como la subunidades M correspondientes a CK-MB. Las subunidades B se determinan mediante una técnica analítica optimizada por la IFCC (Federación Internacional de Química Clínica) con N-Acetylcisteína como activador adicionado de Ac anti CK-M.

- Limitaciones de los métodos de inmunoinhibición (interferentes que producen una sobreestimación de la actividad catalítica de CK-MB):

1- Presencia de macroquinasas (macro CK): Por movilidad electroforética en plasma se distinguen 2 tipos: la macro CK-1 (se sitúa entre las bandas MM y MB) y la macro CK-2 (se ubica entre el cátodo y la banda MM). La macro CK-1 es un complejo constituido por inmunoglobulinas IgG dirigidas a la subunidad B de la CK (tanto de CK BB como de CK MB) mientras que la macro CK-2 está formada por polímeros de CK mitocondrial. La presencia

de macro CK en plasma interfiere por impedimento estérico en las técnicas de inmunoinhibición dando lugar a falsos positivos de la isoenzima CK-MB, pudiendo ocasionar una interpretación errónea en la valoración de pacientes con sospecha de cardiopatía isquémica.

2- Elevación de la isoenzima CK-BB: En condiciones normales la isoenzima BB no se detecta en el plasma de los sujetos sanos, aunque se ha descrito en ciertas situaciones fisiológicas (ejercicio físico intenso y embarazo) y patológicas (encefalopatía hepática, ictus cerebral, enfermedades sanguíneas o cáncer de próstata).

La técnica de inmunoinhibición utiliza Ac anti M que bloquean los monómeros M de las isoenzimas CK-MM y CK-MB, permitiendo que actúe sólo el monómero B de esta última. El sistema considera implícitamente la no existencia de fracción BB en suero, lo que ocurre de manera habitual en pacientes sanos. Así, se interpreta la actividad residual de la muestra (tratada con suero anti-M) que procede exclusivamente del monómero B de la isoenzima CK-MB. Este valor (el 50% de la actividad MB) es duplicado automáticamente obteniéndose así los valores totales de dicha isoenzima. Sin embargo, ante la presencia de isoenzima BB, ésta se mide como MB. Por lo tanto, si se cuenta en el laboratorio con la técnica de inmunoinhibición para medir CK-MB y el paciente tiene concentraciones elevadas de la isoenzima BB, se obtendrá un valor aumentado en forma errónea.

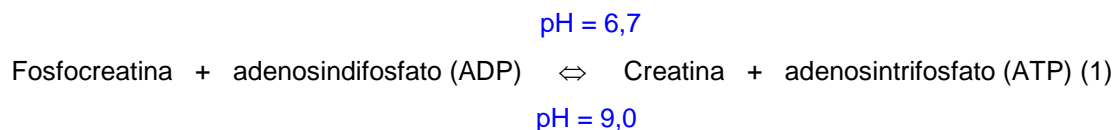
• **MÉTODOS BASADOS EN LA MEDICIÓN DE MASA (CONCENTRACIÓN):**

La mayor parte de los problemas metodológicos asociados a la medida de la actividad catalítica de la CK-MB han sido solventados por la medida de su concentración de masa.

- **Técnicas Fluorométricas-Electroquimioluminiscentes:** el desarrollo de Ac monoclonales, dirigidos específicamente contra los epítopes particulares de subunidades M y B, permite realizar la dosificación de la CK-MB en excelentes condiciones de especificidad, sensibilidad y reproductibilidad. Estos ensayos se encuentran automatizados y constituyen la metodología de elección para el laboratorio clínico.
- **Point of care (POC)** o dispositivos en la cabecera del paciente: en general son ELISAs de tipo doble. Si bien estos métodos ofrecen resultados en forma muy rápida, no poseen un desempeño analítico óptimo.

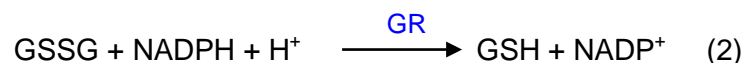
**Especificaciones de la reacción catalizada por CK**

La CK, también llamada creatinfosfokinasa cataliza la fosforilación reversible de creatina por ATP, como se muestra en la siguiente reacción (1):



El ión  $\text{Mg}^{2+}$  es un activador obligado. La enzima en suero es relativamente inestable, perdiendo actividad debido a la oxidación de grupos sulfhidrilo del centro activo. Esta actividad puede ser parcialmente restablecida incubando la muestra con compuestos que contengan grupos sulfhidrilos como N-acetilcisteína, monotioglicerol o glutatión. El reactivo de elección es la N-acetilcisteína pues puede liofilizarse sin problemas, es muy estable y no tiene olor.

Existen interferentes en este sistema de ensayo. El efecto glutatión reductasa es significativo solo cuando se utiliza glutatión reducido (GSH) contaminado con glutatión oxidado (GSSG) como agente reductor. En esta circunstancia cualquier actividad de glutatión reductasa (GR) presente en el suero cataliza la siguiente reacción (2):



El consumo de NADPH en esta reacción resulta en una aparente reducción de la actividad de CK, significando un error por defecto. Este efecto puede ser anulado utilizando un agente con grupos tiol alternativo como N-acetilcisteína. El efecto adenosina quinasa (AK) está causado por una enzima encontrada en elevada concentración en casi todos los tejidos incluidos los eritrocitos, este efecto debido a la presencia de AK en el suero. AK cataliza la siguiente reacción (3):



El ATP es producto también de la primera reacción catalizada por CK, el cual es utilizado como sustrato en la segunda reacción acoplada catalizada por hexoquinasa, luego, la actividad de AK en suero resultaría en un aparente incremento de actividad de CK, lo que lleva a un error por exceso. La actividad de adenosinaquinasa por lo tanto debe ser inhibida y entre los inhibidores más eficaces se encuentran: AMP, diadenosinpentafosfato (Ap5A) y fluoruro ( $\text{F}^-$ ). Aunque el ión fluoruro es un buen inhibidor puede formar la sal de magnesio insoluble ( $\text{MgF}_2$ ) con el ión magnesio presente en el sistema de reacción. Como sabemos el

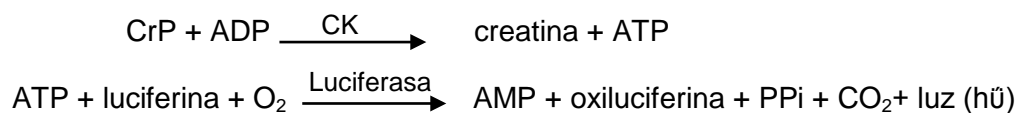
$Mg^{+2}$  es un activador obligado de todas las quinasas formando los complejos ATP –  $Mg^{+2}$  y ADP –  $Mg^{+2}$ , lo cual llevaría a una inhibición de la actividad de CK.

El AMP inhibe efectivamente la actividad de AK proveniente de las isoenzimas presentes de hígado y riñón. El diadenosinpentafosfato (Ap5A) inhibe completamente la actividad de adenosinaquinasa proveniente de músculo y eritrocitos siendo menos efectiva sobre las isoenzimas de hígado y riñón, de ahí que para lograr un efecto inhibitorio total se utiliza en el sistema de reacción una combinación de AMP 5mmol/L y AP5A 10  $\mu$ mol/L en concentraciones finales.

Como puede observarse en la reacción (1), el pH óptimo es de 6,7. En los ensayos para la determinación de actividad de CK se ha demostrado la existencia de una fase de retraso (*lagphase*), que corresponde a un incremento lento en la velocidad de reacción que ocurre luego de la adición de sustrato o suero a la mezcla de reacción. Las típicas fases de retraso en un sistema optimizado son aproximadamente de 110-120 segundos a 25°C; de 90 segundos a 30°C y 60 segundos a 37°C. Este fenómeno tiene implicaciones prácticas ya que puede causar errores por defecto en la velocidad de reacción.

Otro factor importante a tener en cuenta es la presencia de inhibidores endógenos en el suero. El  $Ca^{+2}$  es un importante inhibidor competitivo del  $Mg^{+2}$  el cual es requerido para la completa actividad catalítica de CK. El efecto  $Ca^{+2}$  puede ser anulado por la adición al sistema de reacción de EDTA 2 mmol/L aumentando la concentración de  $Mg^{+2}$  a 10 mmol/L para compensar la unión del  $Mg^{+2}$  por el EDTA.

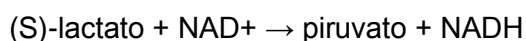
Otras técnicas que están adquiriendo importancia son los ensayos bioquimioluminiscentes por tener mucha mayor sensibilidad que los ensayos espectrofotométricos. En estas técnicas la reacción reversa está acoplada a un sistema luciferina-luciferasa, de acuerdo a la siguiente reacción:



La luz producida en esta reacción medida en un luminómetro es directamente proporcional a la actividad enzimática.

### LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)

La LDH es una enzima citoplasmática que cataliza la reacción:



LDH tiene un PM de 134.000 Da y está compuesta de 4 cadenas polipeptídicas de 2 tipos: M (muscle) y H (heart). La LDH sérica puede dividirse en cinco isoenzimas diferentes en base a su movilidad electroforética decreciente con respecto al ánodo: H4 (LDH-1), H3M (LDH-2), H2M2 (LDH-3), HM3 (LDH-4) y M4 (LDH-5). La actividad de la enzima está presente en todas las células del organismo, variando la distribución de las diferentes isoenzimas en los tejidos. Así, en músculo cardíaco, riñones y eritrocitos predominan las formas LDH-1 y LDH-2, mientras que LDH-4 y LDH-5 están presentes en hígado y músculo esquelético. Como en el caso de CK también se encuentran formas macromoleculares (Macro-LDH) resultado de la asociación con IgG o IgA.

### SIGNIFICADO CLÍNICO

El aumento de LDH aparece a las 9-12 h del inicio del IAM, alcanza un máximo entre las 24 a 48 h y después desciende gradualmente recuperando la normalidad entre los 7 y 14 días siguientes. En este caso la elevación se produce a expensas de la isoenzima LDH-1, que constituye hasta el 45% de la actividad de LDH total. También se utiliza la relación LDH-1/LDH-2, habitualmente es menor que 1, pero en el IAM, excede a la unidad, es decir hay un aumento relativo de la LDH-1 sobre LDH-2. Una relación mayor que 0,7 tiene una sensibilidad diagnóstica del 99%. La utilidad actual de medir LDH total, LDH-1 y razón LDH-1/LDH-2 es en el seguimiento de la evolución a mediano plazo del IAM (4 a 8 días), en caso de no contar con el recurso para determinar troponinas.

### TROPONINAS CARDÍACAS (cTn):

En la actualidad la cTn es el componente central de la definición de un IAM. De acuerdo a las recomendaciones de organismos internacionales como ESC/ACC (*European Society of Cardiology*) y (*American College of Cardiology*), para establecer el diagnóstico de IAM se necesita un aumento o una reducción de los valores de cTn, con al menos un valor por encima del umbral de decisión (límite superior del percentilo 99 de una población de referencia), combinado con una alta probabilidad pretest. Se necesita la demostración de un patrón que sube o baja para distinguir las elevaciones agudas de las crónicas en las concentraciones cTn asociadas a la cardiopatía estructural.

La troponina es una de las proteínas miofibrilares del músculo esquelético que regula la contracción muscular en relación con el ion calcio. Se compone de tres subunidades denominadas troponina T (TnT), troponina I (TnI) y troponina C (TnC). La troponina T regula la tropomiosina, la troponina I inhibe la unión actina-miosina y la troponina C es el receptor

del calcio, ya que al unirse al mismo se produce la inhibición de la acción de la troponina I sobre la tropomiosina, permitiendo la formación de los puentes actina-miosina y activando de este modo la contracción (Figura 4).

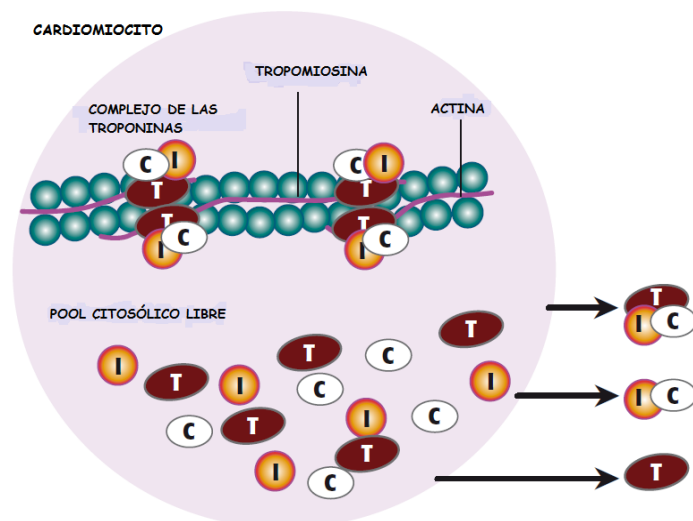


Figura 4. El complejo troponina consta de 3 subunidades (troponina I, T y C) unidas al filamento de actina. El citosol del miocito cardíaco contiene troponinas no unidas que son liberadas a la circulación desde la lesión (<https://doi.org/10.1016/j.rmcl.2015.04.002>)

Las cTnI y cTnT tienen isoformas cardio-específicas que no están presentes en el músculo esquelético, por lo que son marcadores muy específicos de daño miocárdico. En el proceso agudo aumentan dentro de las 2-4 h de la aparición de los síntomas y persisten durante 7-14 días (Figura 5). Este hecho permite que el ensayo seleccionado sea un óptimo indicador para la detección de IAM en aquellos pacientes que no hayan advertido su presencia y concurren a la consulta médica luego de transcurridos varios días. Se recomienda determinaciones seriadas, en general cada 3-6 h. El resultado de la cuantificación de cTn debería estar disponible dentro de los 60 min (preferiblemente a los 30 min).

La alta especificidad de cTnT y cTnI elimina cualquier posibilidad de falsos positivos por el aumento de CK-MB debidos a otras causas de injuria muscular como distrofia muscular, polimiositis, etc. Si bien la elevación de las cTn es específica de daño miocárdico, no lo es de enfermedad coronaria y puede estar aumentada en ausencia de síndrome coronario agudo (miocarditis, embolia pulmonar, ictus, insuficiencia renal, sepsis, disección de aorta, insuficiencia cardíaca, quimioterapia, ejercicio físico extenuante, hipertrofia ventricular, etc). La insuficiencia renal origina en forma frecuente elevaciones de la cTnT respecto a cTnI.

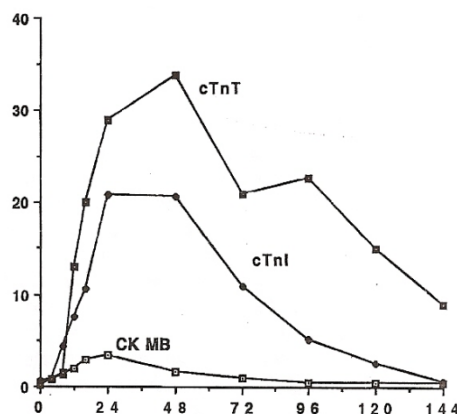


Figura 5. Perfil de los niveles séricos de creatina quinasa-2 (CK-MB), Troponina I (cTnI) y Troponina T (cTnT) después del inicio del infarto agudo de miocardio (Burtis C, Ashwood E, Bruns D. 2006).

Los primeros ensayos para la detección de cTnT y cTnI fueron enzimoimmunoensayos (ELISA) -cuyos límites de detección eran elevados- o técnicas inmunocromatográficas (cualitativas) que no discriminan las diferentes cTn. En la actualidad se dispone de ensayos quimio- o electroquimioluminiscentes que utilizan anticuerpos monoclonales. Si bien en el mercado existe un único fabricante de pruebas para cTnT, diversas marcas comercializan las pruebas de cTnI, existiendo diferencias en los estándares y anticuerpos que emplean. Por lo tanto, no es óptima ni homologable la comparación de los resultados de la determinación de cTnI entre los distintos métodos. La *cromatografía líquida en fase reversa acoplada a espectrometría de masa y análisis de aminoácidos* representa el método de referencia primario para la cuantificación de cTn. Si bien no existe un consenso respecto a las unidades en que se debe informar la concentración de cTn, se sugiere su expresión en SI (ng/L).

La molécula de cTn es sensible a proteólisis en su extremo N-(amino) y C-(carboxi) terminal siendo más estable el fragmento medio, entre los aminoácidos 30 al 110. La proteólisis progresiva induce la circulación de una mezcla compleja de formas moleculares, incluyendo formas binarias o ternarias y libres. Idealmente, los ensayos deben reconocer las diferentes formas acomplejadas y libres, de igual manera. No obstante, se ha demostrado una inmunorreactividad variable a las distintas isoformas, que resulta en una sobre- o subestimación de la concentración de cTn en la muestra. La IFCC recomienda que los fabricantes de reactivos utilicen anticuerpos dirigidos a epítopes ubicados en el fragmento medio de la molécula de cTn, región que no es afectada por la formación de complejos y sufre menos modificaciones en circulación.

Los inmunoanálisis para cTn son susceptibles a interferencias que disminuyen su especificidad diagnóstica. La mayoría de los ensayos cTn utilizan suero o plasma; los



valores de cTn en plasma son 30% más bajos que en suero, por ello se recomienda utilizar siempre el mismo tipo de muestra en el seguimiento del paciente, respetando las indicaciones del fabricante. La coagulación incompleta provoca resultados falsos positivos por la presencia de fibrina. Se deben rechazar las muestras que visualmente se encuentran hemolizadas ya que, dependiendo de la metodología utilizada, la interferencia puede ser positiva o negativa. Las muestras ictericas y lipémicas pueden producir interferencia negativa. Así mismo, la presencia de Ac heterófilos endógenos (HAMA-Ac humanos anti-ratón) y autoanticuerpos afectan de forma diferente la determinación de cTn, según el tipo de Ac utilizado en la técnica de inmunoanálisis. TSH, gonadotropina coriónica, y CA-125 pueden dar valores falsamente elevados de cTn.

Cada laboratorio debe determinar el percentil 99 de un límite de decisión de referencia (punto de corte de decisión médica) para los ensayos de cTn, mediante estudios internos que utilicen el ensayo específico usado en la práctica clínica o la validación de un intervalo de referencia basado en los hallazgos de la literatura. Se definió la imprecisión deseable (expresada como %CV) de cada ensayo de cTn (y ensayo de CK-MB masa) como CV <10% en el percentil 99 del límite de referencia.

#### **EN SÍNTESIS:**

- Sobre la base de contar con una mejor sensibilidad y una especificidad de tejido, si se la compara con otros biomarcadores de necrosis disponibles, se prefiere a la cTn para la detección de daño al miocardio.
- Cuando no se encuentra disponible la cTn, la mejor alternativa es la determinación de CK-MB (medida por ensayo de masa).
- El uso de la actividad de la CK total o de la CK-MB es aceptable para evaluar el daño cardíaco en instituciones donde los ensayos de cTn o CK-MB masa no están disponibles o no son posibles.
- No se recomienda el uso de transaminasa aspartato aminotransferasa, lactato deshidrogenasa total y sus isoenzimas para la evaluación del daño cardíaco y la detección del IAM, debido a que su especificidad y sensibilidad ha sido superada por los marcadores de necrosis antes mencionados.

#### **PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS (PN)**

Esta familia de péptidos y receptores específicos es un sistema integral que participa en la regulación del equilibrio hidromineral y de la presión arterial. Se han identificado, en la actualidad, 5 tipos de péptidos natriuréticos (PN): el péptido natriurético auricular (ANP), el péptido natriurético cerebral o tipo B (BNP), el péptido natriurético tipo C (CNP), el péptido

natriurético endroaspis (DNP) y la urodilatina. El ANP y el BNP inhiben la liberación de endotelina 1 (ET-1) y la ET-1 estimula la síntesis de PN. Los PN poseen diferente origen pero comparten una estructura similar de 17 aminoácidos en su anillo central unidos por un puente disulfuro.

El ANP se expresa y almacena principalmente en gránulos en las aurículas y además se encuentra en pulmones, sistema nervioso central e hipófisis. El BNP es sintetizado en ventrículos, aunque sus valores circulantes son más bajos que los del ANP, en la insuficiencia cardíaca congestiva aumentan notablemente respecto al ANP. El CNP es producido en sistema nervioso central, así también en riñones y células del endotelio vascular. Ambos, ANP y BNP tiene acciones similares con respecto a natriuresis, diuresis y relajación de las fibras musculares lisas de los vasos sanguíneos.

El ANP es liberado en respuesta a la elongación de las fibras musculares del atrio debido a una expansión del volumen o desde los ventrículos en la hipertrofia cardíaca. Tiene efectos directos e indirectos sobre el riñón que resultan en un incremento de la velocidad de filtración glomerular y la excreción de agua, sodio, cloro, magnesio y fosfato. El efecto directo lo ejerce a nivel de los tubos colectores medulares y corticales inhibiendo la reabsorción de sodio y agua, mientras que en el asa de Henle de las nefronas yuxtamedulares disminuye la reabsorción de cloro. Además, ANP contribuye a disminuir la presión arterial a través de la inhibición de la liberación de renina, hormona antidiurética (ADH), aldosterona, catecolaminas, y a nivel del sistema nervioso central, la inhibición de la sensación de sed. La acción de estas hormonas esta mediada por receptores de membrana de tipo A que activan el sistema de la guanilatociclasa para producir GMP cíclico. En los túbulos colectores la producción de GMP cíclico lleva a la clausura de los canales de sodio que habitualmente permiten la entrada de este ión en las células tubulares. Los niveles de ANP y BNP se encuentran elevados en la hipertensión esencial, insuficiencia cardíaca congestiva y cirrosis hepática. El ANP tiene la capacidad de inhibir la acción de factores de crecimiento en diversos tejidos como la zona glomerular de glándulas adrenales, el músculo liso vascular y las células mesangiales del glomérulo renal.

#### MECANISMO DE REGULACIÓN DE ANP

La liberación de estos péptidos está regulada de manera diferencial. En el caso de ANP, su liberación es función de las fibras musculares del atrio mientras que la secreción de BNP es constitutiva, y está relacionada con la hipertrofia ventricular y la insuficiencia cardíaca congestiva. El periodo de vida circulante de ANP es de unos 4 ó 5 minutos en contraste con BNP que alcanza los 20 minutos. El BNP tiene acción natriurética, promueve

la relajación vascular y disminuye la presión arterial en estados de hipervolemia. Además, inhibe el tono simpático, el eje renina angiotensina y la síntesis de moléculas vasoconstrictoras como catecolaminas, angiotensina II, aldosterona y endotelinas. El BNP refuerza el efecto de los diuréticos inhibiendo los centros para el apetito de sal y agua a nivel central.

#### APLICACIÓN CLÍNICA DEL BNP/NT-PROBNP

El BNP y su fracción amino terminal (NT-proBNP) son útiles como biomarcadores de enfermedad cardiovascular. Ambos derivan de los fragmentos C-terminal y N-terminal de una molécula precursora de mayor tamaño (Figura 6). Debido a diferencias en la eliminación, NT-proBNP tiene una vida media mayor que BNP.

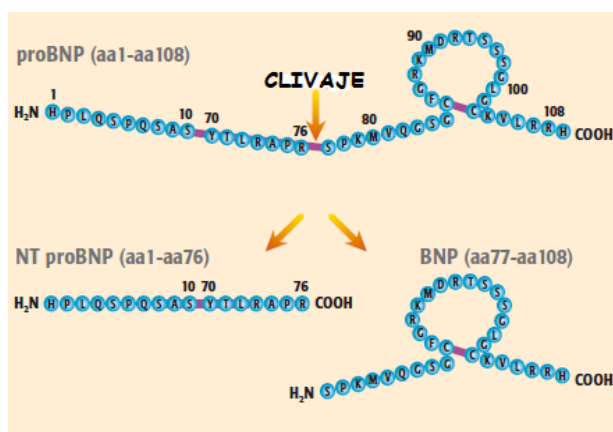


Figura 6. BNP y NT-proBNP son marcadores cuantitativos de stress cardiaco que son liberados a la sangre después de la escisión de la proteína precursora proBNP (<https://doi.org/10.1016/j.rmcl.2015.04.002>)

La mayor utilidad del BNP y NT-proBNP es el diagnóstico y el pronóstico de la insuficiencia cardíaca, principalmente en pacientes que consultan en emergencia por disnea de origen incierto, ya que permite diferenciar la disnea aguda de causa cardiogénica de la pulmonar. Debido a que los valores de BNP se elevan con la edad y pueden estar alterados dependiendo del sexo, enfermedades de base, fármacos, etc, la medida de BNP no debe ser valorada en forma aislada sino en el contexto clínico del paciente (Tabla 1).

Tabla 1: Puntos de corte para la valoración de disneas en emergencia.

<b>DIAGNÓSTICO DE INSUFICIENCIA CARDIACA</b>		
<b>NT-proBNP</b>		<b>BNP</b>
< 50 años	450 pg/mL	> 500 pg/mL
50-75 años	900 pg/mL	
> 75 años	1.800 pg/mL	
<b>EXCLUSIÓN DE INSUFICIENCIA CARDIACA</b>		
Independiente de la edad	300 pg/mL	< 100 pg/mL
<b>ZONA INDETERMINADA</b>		
Entre 300 pg/mL y el valor ajustado a la edad		100-500 pg/mL

Januzzi JL et al. ICON Study. J Am Coll Cardiol 2005; 45 Supl A: 140

## ACTIVIDAD PRÁCTICA

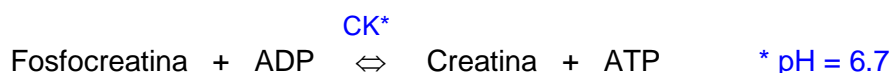
- DETERMINACIÓN DE CK y CK-MB

### 1- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE CREATINA KINASA (CK):

(Método Espectrofotométrico)

#### FUNDAMENTO

Se basa en el siguiente esquema de reacción (método descrito en guía teórica)



Referencias: ATP: Adenosintrifosfato; ADP: adenosindifosfato; CK: Creatina kinasa; G-6-PD: Glucosa-6-Fosfato deshidrogenasa; HK: Hexoquinasa.

Numerosos métodos fotométricos han sido desarrollados para el ensayo de la actividad de CK, utilizando la reacción directa ( $\text{Cr} \rightarrow \text{CrP}$ ) o la reacción reversa ( $\text{CrP} \rightarrow \text{Cr}$ ). La reacción reversa es preferida porque procede con mayor velocidad que la reacción directa. La velocidad de formación del **NADPH determinada por espectrofotometría a 339-340 nm** es una medida de la actividad de CK, teniendo pero se debe tener en cuenta que las concentraciones de todos los demás componentes se encuentren en exceso, es decir que el único factor limitante de la velocidad de la reacción en este sistema de tres enzimas sea la actividad de la CK. Cumplidos estos requisitos el orden de la reacción es cero, por lo tanto independiente de la concentración de sustrato.

#### MUESTRA

- **Se prefiere Suero**

En caso de emplear plasma debe usarse heparina o EDTA como anticoagulante. El citrato y fluoruro producen resultados imprevisibles.

## INTERFERENTES

- La actividad de CK en suero es inestable debido a la oxidación de los grupos sulfhidrilo del centro activo.
- La luz también afecta la estabilidad de la enzima. La estabilidad decrece en el siguiente orden: macroformas de CK, CK-3, CK-2 y CK-1.
- La CK es susceptible a la desnaturalización térmica siendo el grado de inactivación proporcional al incremento de la temperatura, la cual no es restituida por la adición de grupos sulfhidrilos al centro activo.
- Un pequeño grado de hemólisis puede ser tolerado porque los eritrocitos no poseen actividad de CK. No obstante, los sueros con moderada o severa hemólisis no pueden ser utilizados por contener intermediarios del sistema de reacción (ATP, G6P y G6PDH).

## MATERIALES

- Espectrofotómetro
- Micropipetas y pipetas
- Baño de agua
- Cronómetro

## REACTIVOS

Reconstituir un frasco liofilizado con 2,5 mL de solución buffer imidazol pH 6,7.

Las concentraciones finales en este sistema de reacción son las siguientes:

Imidazol .....	100 mmol/L; pH 6,7
Creatina fosfato .....	30 mmol/L
ADP .....	2 mmol/L
Glucosa .....	20 mmol/L
NADP .....	2 mmol/L
Hexoquinasa .....	≥ 2500 U/L
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH)...	≥ 2000 U/L
Acetato de magnesio.....	10 mmol/L
AMP.....	5 mmol/L
di-(adenosina-5') pentafofosfato.....	10 mmol/L
N-acetilcisteína.....	20 mmol/L

Estabilidad del reactivo: El sustrato reconstituido es estable 15 - 20 días entre 2-8°C a partir de la fecha de su preparación.

## PROCEDIMIENTO

- Incubar el frasco de sustrato reconstituido a 25°C durante 3-4 minutos y luego agregar 100 µL de suero, mezclar suavemente por rotación cuidando de no producir espuma (desnaturalización de las proteínas enzimáticas).
- Colocar inmediatamente el contenido en la cubeta de medición y preincubar 3 minutos. Poner en marcha el cronómetro y leer a 340 nm los valores de absorbancia

cada 60 segundos hasta que 3 lecturas consecutivas muestren constancia de los cambios de absorbancia.

- Promediar los  $\Delta A$  y multiplicarlo por el factor: 4,127.

## CÁLCULOS

$$U/L (\mu\text{mmol}/\text{min}/L) = \frac{\Delta A/\text{min} \times 2,60}{6,3 \times 10^{-3} \times 0,10} = \Delta A/\text{min} \times 4,127$$

2,60 = volúmen total en la cubeta en mililitros

0,10 = volúmen de suero en mililitros.

$6,3 \times 10^{-3}$  = coeficiente de absorción micromolar de NADPH a 340 nm.

$\Delta A/\text{min}$  = cambio de absorbancia promedio por minuto.

## VALORES DE REFERENCIA

Para CK medido a 25 °C (340 nm)

Mujeres: 10 - 55 UI/L

Hombres: 10 - 65 UI/L

## 2- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE CK-MB

(Método Espectrofotométrico)

Es el marcador cardíaco más utilizado para el diagnóstico precoz del IAM. Comienza a elevarse a las 4 a 6 h haciendo un pico de actividad en el entorno de las 24 h, retornando a valores basales entre 48-72 h.

Actualmente, las técnicas más utilizadas se basan en la inhibición específica de las subunidades M con anticuerpos monoclonales y luego se mide la actividad de la subunidad B activada con N-acetilcisteína. Existen otros ensayos como: quimioluminiscencia, polarización de fluorescencia que en lugar de medir actividad enzimática miden masa proteica y sus resultados son por lo tanto expresados en unidades de masa: miligramos, microgramos, etc. Si bien estos ensayos son más precisos desde el punto de vista cuantitativo, porque miden masa y no actividad enzimática (la cual puede estar inhibida por variables no controladas o no conocidas) tienen la desventaja de ser más lentos y costosos.

Para la realización del ensayo de CK-MB como para todos los otros ensayos, se siguen las indicaciones consignadas por el fabricante de cada kit.

Para el caso de las determinaciones de CK sea total o MB se debe tener en cuenta que luego de adicionar el suero al sistema de reacción, para medir la cinética de la misma existe un período llamado de "lag" o de retraso de dos o tres minutos hasta que la cinética se hace lineal con pendiente constante. También se debe considerar que los diferentes

sustratos se deben encontrar en concentraciones tales que determinen que la cinética de la reacción sea de “orden cero” (0) permitiendo de esa manera que la velocidad de la reacción enzimática sea determinada únicamente por la concentración de la enzima y la concentración de los sustratos no sean factores determinantes de la misma.

## MUESTRA

Se prefiere **Suero**

En caso de emplear plasma debe usarse heparina o EDTA como anticoagulante.

## MATERIALES

- Espectrofotómetro
- Micropipetas y pipetas
- Baño de agua
- Cronómetro

## REACTIVOS

Reconstituir un frasco liofilizado con 2,5 mL de solución buffer imidazol pH 6,7.

Las concentraciones finales en este sistema de reacción son las siguientes:

Imidazol .....	100 mmol/L; pH 6,7
Creatina fosfato .....	30 mmol/L
ADP .....	2 mmol/L
Glucosa .....	20 mmol/L
NADP .....	2 mmol/L
Hexoquinasa .....	≥ 2500 U/L
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH)...	≥ 2000 U/L
Acetato de magnesio.....	10 mmol/L
AMP.....	5 mmol/L
di-(adenosina-5') pentafofato.....	10 mmol/L
N-acetil cisteína.....	20 mmol/L
Anticuerpo monoclonal anti CK-M .....	≥ 1000 U/L

Estabilidad del reactivo: el sustrato reconstituido es estable 15 - 20 días entre 2-8 °C a partir de la fecha de su preparación.

## PROCEDIMIENTO

- Llevar a cero el espectrofotómetro con agua destilada, luego preincubar el sustrato reconstituido a 25°C.
- Agregar al sistema de reacción 100 µL de suero y mezclar suavemente por inversión. Dejar reposar 10 minutos y verter el contenido a la cubeta de medición.
- Registrar los  $\Delta A$  en un espectrofotómetro a 340 nm, durante 5 minutos y hacer un promedio de los datos obtenidos.



## CÁLCULOS

$$\text{CK-MB (U/L)} = \Delta A / \text{minuto} \times \text{factor (8,254)}$$

## VALORES DE REFERENCIA

El límite de actividad a 25 °C es de 10 U/L y no mayor del 20% del valor total de actividad de CK.

## RESOLUCIÓN DE CASOS CLÍNICOS

### Caso 1

Paciente de 30 años de edad, fumador de 30 cigarrillos por día, consulta en el Servicio de Urgencia por molestias precordiales de 6 h de evolución, que el paciente asociaba a estrés. Refiere que 48 h antes de su ingreso realizó una sesión de pesas y abdominales, luego de 6 meses de no ejercitarse. El electrocardiograma no mostró alteraciones globales ni segmentarias del ventrículo izquierdo, con diámetros y función sistólica conservada. **Datos de laboratorio:** CK: 556 UI/L (VR: < 180 UI/L); CK-MB: 190 UI/L (VR: < 24 UI/L, Mét. Inmunoinhibición); Troponina T: 0,015 µg/mL (VR: < 0,01 UI/L).

1- ¿Podría proponer un diagnóstico presuntivo para este paciente? JSR.

### Caso 2

Un paciente de 58 años acude al servicio de urgencias por un cuadro de opresión centrotorácica de 4 h de evolución, sin dolor franco. El electrocardiograma no evidenció alteraciones. El médico solicita la determinación de troponina en sangre, la cual se realiza dentro del mismo servicio por una metodología POC, obteniéndose un valor de 0,06 ng/mL (VR: <0,04 ng/mL). Ante la sospecha de IAM, el paciente es ingresado para evaluar su evolución. La determinación de troponina se repite en dos ocasiones en el transcurso de las primeras 12 h post-internación, por electroquimiolumiscencia. En ambas oportunidades, sus valores fueron de 0,015 ng/mL, manteniéndose el paciente sin cambios en el electrocardiograma.

1- Proponga una explicación para los valores discordantes encontrados en la determinación de troponinas en el paciente.

### Caso 3

Jóven de 20 años, transportado en ambulancia al servicio de urgencias por alteración del estado de conciencia. Presentaba una frecuencia cardiaca de 133 latidos/min; frecuencia respiratoria de 10 respiraciones/min; tensión arterial de 130/100 mmHg; temperatura de

36,2 °C. Antecedentes relevantes: historia de consumo de sustancias psicoactivas. Laboratorio: hemoglobina 15 g/dL; leucocitos 18.500/mm<sup>3</sup> (85% neutrófilos). Función renal y hepática conservada. Gases arteriales (FIO<sub>2</sub> de 35%): pH: 7,3; PCO<sub>2</sub>: 42; PO<sub>2</sub>: 67; HCO<sub>3</sub>: 19; PaFi: 220. Durante el manejo en urgencias el presentó dolor precordial no irradiado, de intensidad moderada. El electrocardiograma mostró supradesnivel del segmento ST en la cara anterolateral. Se solicitó: CK= 172 (VR< 180 U/l); CK-MB= 21 (VR< 25 U/l); troponina I: 0,62 ng/mL (VR: 0-0,3 ng/ml).

1- ¿Evidencia el paciente alguna alteración del equilibrio ácido-base o de la oxigenación?

Sí - No ¿Por qué?

2- Proponga un diagnóstico presuntivo para este paciente. JSR.

## BIBLIOGRAFÍA

- DOCUMENTO DE CONSENSO DE EXPERTOS. TERCERA DEFINICIÓN UNIVERSAL DE INFARTO DE MIOCARDIO. Revista Española de Cardiología 2013; 66:132.e1-e15.
- MEDICINA DE LABORATORIO. FUNDAMENTOS Y APLICACIONES EN EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO. I Antonozzi y E Gulletta. 1ª Edición. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires 2015.
- HARRISON PRINCIPIOS DE MEDICINA INTERNA. DL Longo, AS Fauci, DL Kasper, SL Hauser, JL Jameson, J Loscolzo J. 18ª Edición. Ed. Mc. Graw Hill, España 2012.
- EL LABORATORIO EN EL DIAGNOSTICO CLINICO. JB HENRY. 20ª Edición. Ed. Marbán, España 2010.
- FISIOPATOLOGÍA. SALUD-ENFERMEDAD: UN ENFOQUE CONCEPTUAL. CM Porth. 7ª Edición. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires 2006.
- TIETZ TEXTBOOK OF CLINICAL CHEMISTRY AND MOLECULAR DIAGNOSTICS. C Burtis, E Ashwood y D Bruns. 4ª Edición. Ed. Saunders Elsevier, México 2006.