

Manual de prácticas de laboratorio de Bioquímica Clínica

Isaac Zamora Bello
Eduardo Rivadeneyra Domínguez
María Azucena Mendoza Fernández



Esta obra se encuentra disponible en Acceso Abierto para copiarse, distribuirse y transmitirse con propósitos no comerciales. Todas las formas de reproducción, adaptación y/o traducción por medios mecánicos o electrónicos deberán indicar como fuente de origen a la obra y su(s) autor(es). Se debe obtener autorización de la Universidad Veracruzana para cualquier uso comercial. La persona o institución que distorsione, mutile o modifique el contenido de la obra será responsable por las acciones legales que genere e indemnizará a la Universidad Veracruzana por cualquier obligación que surja conforme a la legislación aplicable.

MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

MARTÍN GERARDO AGUILAR SÁNCHEZ

Rector

ARTURO AGUILAR YE

Secretario Académico

LIZBETH MARGARITA VIVEROS CANCINO

Secretaria de Administración y Finanzas

JAQUELINE DEL CARMEN JONGITUD ZAMORA

Secretaria de Desarrollo Institucional

AGUSTÍN DEL MORAL TEJEDA

Director Editorial

MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

ISAAC ZAMORA BELLO

EDUARDO RIVADENEYRA DOMÍNGUEZ

MARÍA AZUCENA MENDOZA FERNÁNDEZ



Universidad Veracruzana
Dirección Editorial

Clasificación LC:	RB112.5 M46 2025
Clasif. Dewey:	612.01585
Autor:	Zamora Bello, Isaac.
Título:	Manual de prácticas de laboratorio de bioquímica clínica / Isaac Zamora Bello, Eduardo Rivadeneira Domínguez, María Azucena Mendoza Fernández.
Edición:	Primera edición.
Pie de imprenta:	Xalapa, Veracruz, México : Universidad Veracruzana, Dirección Editorial, 2025.
Descripción física:	238 páginas : ilustraciones (algunas en color) ; 21 cm.
Serie:	(Textos Universitarios)
ISBN:	9789689735403
Materia:	Bioquímica clínica--Manuales de laboratorio.
Autores relacionados:	Rivadeneira Domínguez, Eduardo Mendoza Fernández, María Azucena.
DGBUV 2025/53	

Diseño de colección: Aída Pozos Villanueva

Diseño de forros de la colección: Enriqueta del Rosario López Andrade

Primera edición, 8 de diciembre de 2025

D. R. © Universidad Veracruzana

Dirección Editorial

Nogueira núm. 7, Centro, CP 91000

Xalapa, Veracruz, México

Tels. 228 818 59 80; 228 818 13 88

direccioneditorial@uv.mx

<https://www.uv.mx/editorial>

ISBN: 978-968-9735-40-3

DOI: 10.25009/uv.9735403

Este libro fue editado bajo un proceso certificado por la Norma ISO 9001:2015

CONTENIDO

Introducción	7
Unidad 1. Control de calidad	9
Unidad 2. Legislación de laboratorio clínico	33
Unidad 3. Diagnóstico de alteraciones en la glucosa sanguínea	35
Unidad 4. Valoración de la función renal	51
Unidad 5. Aplicación diagnóstica de la determinación de proteínas plasmáticas	63
Unidad 6. Estudio de los lípidos y dislipoproteinemias colesterol total, método CHOD- PAP, colesterol LDL y HDL. Triacilglicéridos método cinético	71
Unidad 7. Análisis de electrolitos séricos	87
Unidad 8. Valoración de función renal y vías urinarias	101
Unidad 9. Pruebas de función hepática y vías biliares	127
Unidad 10. Perfil pancreático, alfa amilasa, lipasa.	155

Unidad 11. Perfil cardiaco, creatinfosfoquinasa (CK), aspartato aminotransferasa, deshidrogenasa láctica, CK-MB	163
Unidad 12. Análisis bioquímico de líquido cefalorraquídeo	179
Unidad 13. Análisis de líquido seminal, espermatozoides directos	185
Apéndice A. Cuestionarios de prácticas	197
Referencias	205
ANEXOS	
Anexo 1. Apéndice normativo	213
Anexo 2. Práctica complementaria	231
Videos grabados en el Laboratorio de la Facultad de Química Farmacéutica Biológica	239

INTRODUCCIÓN

La bioquímica clínica es la rama de la medicina que se ocupa del estudio de los aspectos bioquímicos de la vida humana, en la salud y en la enfermedad. También estudia la aplicación de los métodos bioquímicos de laboratorio para el diagnóstico, el control del tratamiento, la prevención y la investigación de los procesos patológicos.

Asimismo, es fundamental para la práctica de la medicina, debido a que muchas enfermedades tienen una base bioquímica que explica los fenómenos patológicos a nivel celular. Desde hace varias décadas, la aplicación de los principios de esta ciencia al análisis de líquidos y tejidos ha servido como una valiosa ayuda para los médicos en el diagnóstico y el pronóstico, así como en el seguimiento de la evolución de una enfermedad.

El plan de estudios de la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo de la Universidad Veracruzana contempla la experiencia educativa Bioquímica Clínica, dentro del área disciplinar, ya que incide significativamente en muchas experiencias educativas (EE) del área de la biomedicina, de la farmacia, de los alimentos y en las tareas propias de la investigación. Es de suma trascendencia estar a la vanguardia en los principales avances científicos y tecnológicos de las diversas disciplinas que conforman las carreras profesionales. Además, es necesaria la constante actualización e incorporación de nuevos desarrollos en la investigación. En el área de la bioquímica clínica se generan constantemente nuevos conocimientos, que impactan tanto la teoría como la práctica de esta disciplina. Por lo anterior, los programas de estudio exigen una actualización constante, así como la producción y la vigencia de materiales didácticos utilizados como apoyo al impartir las experiencias educativas. Es el caso de los manuales de laboratorio.

Por lo anterior, es indispensable actualizar los conocimientos que fundamentan esta experiencia educativa, además de buscar una mejora en el proceso

enseñanza-aprendizaje y en la vinculación teórico-práctica. De esta forma, el MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA es un recurso que facilita el aprendizaje teórico-práctico de los estudiantes, sustentado en una revisión bibliográfica actualizada y apoyada con estructuras químicas, que ayuden a hacer más didáctica la presentación.

Al final de este libro se encuentran las ligas que direccionan a los videos grabados en los laboratorios de la Facultad de Química Farmacéutica Biológica, región Xalapa, a fin de que los estudiantes puedan observar más claramente el desarrollo y la ejecución de cada una de las prácticas que se contemplan en el programa de Laboratorio Bioquímica Clínica, como experiencia educativa.

Los autores de este libro desarrollamos este material con el propósito de atender los intereses y los compromisos, tanto académicos como disciplinares, de la Facultad de Química Farmacéutica Biológica, así como de las facultades de Bioanálisis, de Medicina, de Biología y de Nutrición, fundamentalmente. Desde luego, este libro también será accesible para todas las escuelas del ramo, así como para los profesionales interesados en este importante campo del conocimiento.

Los materiales que aquí se presentan proporcionarán a los estudiantes los conocimientos y los recursos necesarios para la realización de las prácticas de laboratorio sugeridas, actualmente, tanto en la investigación como en el campo laboral. Estas habilidades adquiridas durante el periodo de desarrollo y formación profesional repercutirán en un mejor desempeño profesional de nuestros egresados en el futuro próximo.

UNIDAD 1. CONTROL DE CALIDAD

PRÁCTICA 1

CONTROL DE CALIDAD EN EL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

DURACIÓN: 2 HORAS

Objetivo

- Que el estudiante conozca las tres etapas fundamentales del control de calidad para aplicarlas en las diferentes áreas del laboratorio clínico en el que se desempeñe.

Generalidades

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

Evaluación de métodos

En México, el Reglamento de la Ley General de Salud rige las metas de calidad. En su artículo 158 señala que los laboratorios deberán emplear reactivos y medios de cultivo de la más alta calidad y se cuenta con organismos que acreditan la competencia técnica, como la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA). La decisión de aceptar o rechazar un método posible para el laboratorio debe basarse en la capacidad del método para cumplir con los requisitos del médico, que se reconoce como el usuario final, pues es el profesional que utiliza los resultados de la prueba del laboratorio como insumo para la elaboración de sus diagnósticos y para la toma de decisiones.

Características del método

El paso siguiente en el proceso de selección es la definición de las características metodológicas ideales que permitirán que el método seleccionado tenga buena probabilidad de éxito en el laboratorio. Estas características incluyen la metodología preferida, que tendrá potencialmente la especificidad química (libre de interferencias) y la sensibilidad química necesarias (capacidad de detectar cantidades pequeñas o pequeños cambios en la concentración del compuesto analizado). La capacidad de usar estándares acuosos para calibrar, la adecuada elección de reactivos, la temperatura, el tiempo de reacción, así como el tiempo y el tipo de medición (como métodos de determinación de un punto, dos puntos o cinéticos) son características que deben definirse en un método.

La *Internacional of Federation Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (IFCC) y la Asociación Americana de Química Clínica (AACC) han desarrollado una serie de recomendaciones para los métodos empleados en química clínica, entre los que se cuenta la familiaridad del operador con el procedimiento del método, la estabilidad de calibradores, controles y reactivos, así como la linealidad de la respuesta a través de todo el intervalo de trabajo.

Error aleatorio y error sistemático

Los errores que afectan el rendimiento de los procedimientos analíticos se clasifican en aleatorios o sistemáticos. Los factores que contribuyen al error aleatorio son los que afectan la reproducibilidad de la medición. Entre estos se incluyen: 1) la inestabilidad del instrumento, 2) variaciones en la temperatura, 3) variaciones en los reactivos y calibradores (y la estabilidad de la curva de calibración), 4) variabilidad en las técnicas de manejo como pipeteo, mezcla y control de los tiempos y 5) variabilidad en los operadores.

Estos factores sobreponen sus efectos entre sí a diferentes tiempos. Algunos producen fluctuaciones muy rápidas y en otros ocurre en periodos más largos. Por consiguiente, el error aleatorio (RE) tiene componentes diferentes de variación que se relacionan con la disposición actual del laboratorio.

El componente de variación dentro de una corrida es causado por etapas específicas en el proceso, tales como la precisión en el pipeteo y las variaciones de temperatura a corto plazo, así como la estabilidad del instrumento. La variación intradiaria entre corridas es causada por la inestabilidad de la curva de calibración o por diferencias en recalibración que ocurren a través del día, variaciones a más largo plazo en el instrumento, cambios pequeños en las condiciones del laboratorio durante el día y la fatiga del personal del laboratorio.

El componente intradiario de variación es causado por variaciones en el instrumento que ocurren a través de los días, cambios en los calibradores y reactivos (especialmente si se abren frascos nuevos cada día) y cambios en el personal de día a día. Aunque no es un componente aleatorio real de variación, cualquier variación en la curva de calibración a través del tiempo también afectará de manera considerable el componente intradiario de variación. Estos componentes se pueden combinar de modo que se pueda obtener un cálculo de la varianza total del método.

Entre los términos usados para indicar el error aleatorio se incluyen los siguientes: 1) precisión, 2) imprecisión, 3) reproducibilidad y 4) repetibilidad. En cada uno de los casos se refieren a la dispersión aleatoria de los resultados de las

mediciones alrededor de algún punto de tendencia central. El error sistemático (ES) describe el error que es consistentemente alto o bajo. Si el error es consistentemente bajo o alto en la misma cantidad, independiente de la concentración, se designa como error sistemático constante (ESC). Si el error es consistentemente bajo o alto en una cantidad proporcional a la concentración del compuesto analizado, se conoce como error sistemático proporcional (ESP).

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

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

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

El límite de cuantificación (LQ) es el valor mínimo de la magnitud que puede estimarse con una imprecisión aceptada (habitualmente 10%) (IUPAC). El límite de detección (LD) que es el valor mínimo de la magnitud para el cual la probabilidad de que el valor estimado no exceda al valor crítico es β (habitualmente 0.05). El valor crítico (LC) que es el valor mínimo de la estimación de una magnitud para el cual la probabilidad de que el valor verdadero de la magnitud sea cero es α (habitualmente 0.05). En el laboratorio clínico, los interferentes más frecuentes son hemólisis, lipemia e ictericia. Para todos los métodos espectrofotométricos se deben determinar los efectos de hemólisis, ictericia y lipemia. También deben ensayarse otras sustancias reportadas como interferentes para métodos similares. El pipeteo debe ser preciso para que las muestras de línea de base y las que contienen el interferente reflejen el mismo grado de dilución y sean exactas; lo anterior con el fin de añadir una cantidad conocida de sustancia interferente. Nuevamente, resulta importante que la concentración del compuesto analizado en la muestra esté cercana a los niveles de decisión médica.

Dilución

Algunas veces, la dilución de una muestra que contiene interferentes espectrales puede reducir el problema. Se debe ser cuidadoso para no diluir en exceso el compuesto deseado o el cromógeno a una concentración por debajo del nivel mínimo detectable para el ensayo. Muchas diluciones deben analizarse simultáneamente para determinar la más efectiva. Aunque una solución muy práctica y efectiva es realizar un blanco de problema; este consiste en poner la muestra a analizar en el líquido diluyente y restarla al tubo de desarrollo de color.

Interferencias químicas

Las interferencias discutidas hasta ahora son interferencias espectrales causadas por compuestos que no participan en la reacción química analítica. No obstante, muchas reaccionan con las sustancias analizadas. Los productos de reacción de

estas interferencias en general provocan interferencias positivas, aunque también se han observado negativas. Los tipos de interferentes reactivos químicamente no específicos pueden variar de manera considerable. El ácido úrico produce una interferencia positiva; por su parte, la bilirrubina y el ácido ascórbico producen interferencias negativas en los métodos de glucosa oxidasa usados para medir la glucosa. La reacción de picrato alcalino para la medición de creatinina presenta ambas interferencias positivas (cetonas, proteínas) y negativas (bilirrubina).

Corrección de las interferencias químicas

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

- Diluyendo el interferente.
- Aumentando la especificidad de la reacción.
- Removiendo el interferente.
- Monitoreando un ensayo por medición cinética.
- Monitoreando un ensayo por medición bicromática.

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

El aumento de especificidad de una reacción analítica es a menudo logrado por el uso de enzimas específicas como reactivas. Los ejemplos de este método incluyen 1) la medición de glucosa por hexocinasa o glucosa oxidasa, 2) ácido úrico por uricasa y 3) urea por ureasa. Las reacciones con base inmunoquímica también se usan para aumentar la especificidad del análisis. Un ejemplo de esto es la medida de teofilina por inmunoensayo enzimático, comparado con otros métodos que emplean absorbancia ultravioleta. La separación de un interferente

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

Información sobre el control de calidad en el laboratorio clínico

El laboratorio clínico es un servicio médico indispensable. Su importancia ha ido creciendo y desarrollándose a lo largo de los años hasta ocupar un lugar central en la medicina. La meta fundamental de los laboratorios clínicos es proporcionar datos confiables acerca de la composición de muestras obtenidas de pacientes, de tal forma que puedan contribuir al diagnóstico, tratamiento y seguimiento de diversas enfermedades.

La obtención de datos verdaderamente confiables requiere de la rigurosa aplicación de diferentes técnicas de control de calidad, teniendo siempre en cuenta que el mejor sistema de control es el que permite prevenir, identificar y corregir los errores. Pueden presentarse serias deficiencias cuando no se dedica la atención suficiente a la calidad.

Un laboratorio clínico debe tener como uno de sus propósitos principales la producción de datos analíticos de alta calidad, por medio del uso de mediciones analíticas que sean precisas, exactas y adecuadas para tal fin, lo que conduce a resultados confiables. Para concretar este propósito es necesario utilizar programas de control de calidad interno y externo. Entre otros elementos, debe recordarse que se puede tener buena o mala calidad en todo tipo de sistemas analíticos, ya sean manuales o automatizados, por lo que debe tenerse mucho cuidado en ambos casos. La meta de un sistema de control de calidad es que la variación en las determinaciones desarrolladas en el laboratorio sea lo suficientemente pequeña para que la utilidad no se afecte.

La realización de cualquier procedimiento analítico puede estar amenazada por la comisión de un sinnúmero de errores, algunos de los cuales pueden

tener consecuencias realmente serias. Actualmente, se requiere controlar la operación total, incluyendo las etapas preanalítica, analítica y posanalítica, frente a la demanda creciente de los usuarios del laboratorio clínico (médicos y pacientes), como resultado del avance científico y tecnológico.

Etapas preanalítica

Los médicos solicitan las pruebas de laboratorio que miden un compuesto analizado en un espécimen de sangre u otro fluido corporal para evaluar el estado del paciente. Se asume que el resultado analítico que se obtiene es representativo de la concentración real del compuesto analizado en el paciente. Desafortunadamente, hay numerosos factores que pueden invalidar esta suposición. Un número de errores no analíticos también puede cambiar la concentración de uno o más compuestos analizados en un espécimen, de tal forma que los resultados no reflejen la condición fisiológica del individuo. Estos factores se conocen como fuentes de error preanalítico. De la misma forma en que se limita el error analítico al controlar la temperatura, la longitud de onda y el tiempo de incubación, el error preanalítico también puede ser controlado. Es responsabilidad de los laboratorios aplicar las medidas que minimicen las fuentes de error, desarrollando procedimientos estandarizados referidos a la preparación del paciente, a la recolección de la muestra, a los métodos de transporte y a la preservación de la misma.

Causas de variación previas a la recolecta

a) Variables del ciclo biológico

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

diana, misma que ocurre durante el transcurso de un solo día. La variación cíclica durante un periodo mayor que un día (infradiana), también puede afectar los resultados en las pruebas de laboratorio. La variación circanual, la cual ha sido reportada en algunas sustancias, se relaciona con cambios en la dieta debido a la estación o a la variación del clima.

Dentro de los diferentes tipos de variaciones encontramos: infradiana, que es mayor a un día, como por ejemplo el ciclo menstrual, la circadiana que dura alrededor de un día, y la ulfradiana, que dura menos de 24 horas.

Pruebas sujetas a variación diurna:

- Fosfatasa ácida*
- ACTH (hormona corticotropica)
- Catecolaminas
- Cortisol (y otros esteroides adrenales)
- Gastrina*
- Hormona del crecimiento*
- Tolerancia a la glucosa
- Hierro
- Osteocalcina*
- Hormona
- Paratiroidea*
- Prolactina*
- Renina/aldosteona TSH*

Pruebas afectadas por la ingestión de alimentos:

- Cloro**
- Gastrina

* Más alta en pasado meridiano (PM) y las otras más altas antes del meridiano (AM).

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

- Glucagón
- Glucosa
- Hormona del crecimiento
- Insulina
- Calcio Ionizado fosfato**
- Potasio**
- Triglicéridos
- pH en orina

b) Variables físicas relacionadas con el paciente

El ejercicio físico es una causa común controlable de variación en los resultados de las pruebas de laboratorio. Dentro de las pruebas químicas de rutina se ha observado que el potasio, el fósforo, la creatinina y las proteínas séricas son significativamente alterados por un periodo breve de ejercicio. Con el ejercicio regular, se presenta un aumento en las enzimas relacionadas con la actividad muscular y un aumento en la concentración de ácido úrico en sangre. El ejercicio intenso, como correr en un maratón, produce una rápida elevación en la concentración del potasio, el ácido úrico, la bilirrubina y las enzimas musculares, mientras que la concentración de glucosa y de fósforo disminuye significativamente. En personas sometidas a entrenamiento para competencias de distancias largas, las concentraciones de gonadotropina y esteroides sexuales están marcadamente disminuidas, mientras que la concentración de prolactina está aumentada. La postura es una causa de variación preanalítica fácilmente controlable. En la posición de pie, se observa que un incremento en la presión hidrostática causa pérdida de agua y electrolitos procedentes del compartimiento del líquido intravascular, lo que a su vez da como resultado un aumento en la concentración de proteínas.

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

Procedimientos para minimizar las variables en el paciente

a) Variables biológicas cíclicas

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

b) Variables físicas

Si se están coleccionando muestras para medir compuestos analizados, que son afectados por el ejercicio, es necesario interrogar al paciente para saber si ha realizado ejercicios vigorosos en las últimas 24 a 48 horas. Cualquier historia de ejercicio vigoroso deberá ser anotada en la forma de requisición e incluirse en el reporte final. Otra alternativa será pedirle al paciente que regrese después para tomar la muestra. Antes de la toma de muestra, el estado de estrés es difícil de controlar; sin embargo, los médicos deberán estar informados sobre aquellas pruebas que pueden estar afectadas, así como de la magnitud del cambio inducido por el estrés, ya sea físico o mental.

Hay casos en los que es recomendable que el laboratorio solicite asesoría especial antes de desarrollar pruebas que son severamente afectadas por el estrés del paciente, tales como las pruebas de función adrenal o pituitaria, metabolitos de catecolaminas, análisis de lípidos y prueba de tolerancia a la glucosa. Los efectos provocados por la postura pueden minimizarse pidiendo a los pacientes ambulatorios que permanezcan sentados por lo menos 15 minutos antes de la extracción de la sangre. Para los análisis que sufren alteraciones por la dieta, incluyendo las mediciones de tolerancia a la glucosa, hidroxiprolina, 5-HIAA y los metabolitos de las catecolaminas urinarias, es recomendable proveer al paciente

con las indicaciones por escrito, antes de ser programado para la colecta de la muestra. Si pruebas tales como la medición de renina y aldosterona, tolerancia a la glucosa, orina de 24 horas, grasa en heces de 72 horas, requieren de una preparación especial del paciente, resulta buena práctica citar antes al paciente para entregarle una explicación detallada en una hoja impresa.

Causas de variación en la recolecta de sangre

Técnicas para la recolecta de sangre

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

En la mayoría de los laboratorios, los especímenes se colectan usando tubos al vacío y agujas especialmente diseñadas, que simultáneamente permiten la punción de la vena y del tapón del tubo. Los tubos para colecta están hechos de vidrio y plástico, estos últimos se usan con mayor frecuencia; sin embargo, ambos son apropiados para la mayoría de las pruebas. Muchos tubos están cubiertos con silicón, material que reduce la adhesión del coágulo, permitiendo mejor separación del suero y de las células. Los tapones están típicamente hechos de hule. En niños y adultos con difícil acceso venoso, puede hacerse una punción capilar para la obtención de la muestra. Ciertos microtubos especiales, que contienen anticoagulantes, pueden llenarse por capilaridad. La contaminación de la muestra con fluidos de tejido es una causa potencial de preocupación en todos los procedimientos de colección capilar de sangre, ya que el fluido tisular virtualmente no contiene proteínas y, por lo tanto, no tiene compuestos analizados unidos a proteínas. Este tipo de contaminación puede ser minimizado usando solo la sangre que fluye libremente del sitio de punción.

Tipos de muestras de sangre

Las diferencias que existen entre sangre arterial, venosa y capilar son causas ocasionales de resultados erróneos. La sangre arterial es la fuente de nutrientes para todos los tejidos del cuerpo y es la mejor muestra para el análisis de la distribución de sustancias necesarias para los tejidos corporales como el oxígeno. La sangre venosa difiere de la sangre arterial en que tiene menor concentración de sustancias usadas en el metabolismo, tales como oxígeno y glucosa; a su vez, presenta más altas concentraciones de productos de desecho, tales como ácidos orgánicos, amoníaco y dióxido de carbono. Si sitios específicos, como el pie, se mantienen tibios, se pueden obtener muestras de sangre capilar que son muy parecidas a las de sangre arterial. En estados de poca perfusión tisular y en los neonatos, hay una diferencia significativa entre la presión parcial de oxígeno (PO_2) de la sangre capilar y de la arterial.

a) Errores relacionados con preservativos y anticoagulantes

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

El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) contenido en el tubo utilizado para la recolección de muestras en hematología se usa también para algunos ensayos

químicos, porque la quelación de los cationes divalentes inactiva muchas enzimas y conduce a cambios *in vitro* de hormonas peptídicas y lípidos. La quelación de cationes tales como el hierro, el magnesio y el calcio causa una disminución artificial de los resultados en la mayoría de los ensayos colorimétricos y reduce la actividad de enzimas, que requieren cationes activadores (fosfatasa alcalina y creatina cinasa).

La contaminación de muestras con anticoagulantes, especialmente EDTA, es un problema común en muchos laboratorios. Debido al potencial del EDTA para interferir en muchos ensayos, es recomendable que los tubos que contienen EDTA deban llenarse al último. Si se está usando anticoagulante líquido, es importante asegurar que la cantidad de sangre y anticoagulante sea proporcional.

b) Errores relacionados con los tubos separadores de suero

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

c) Errores relacionados con las técnicas de recolecta inadecuada

Torniquetes

El uso de los torniquetes constituye una importante causa de variación en los resultados de pruebas de laboratorio que se puede controlar. Los torniquetes son

ampliamente usados en flebotomías para bloquear el retorno venoso, causando dilatación de las venas y haciendo más fácil la identificación de un sitio de venopunción. Los torniquetes a menudo permanecen colocados durante el proceso de venopunción asumiendo que la continua dilatación venosa permitirá una colecta más rápida de la muestra y evitará el colapso de la vena.

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

Hemólisis

La hemólisis ocurre cada vez que hay un trauma en los relativamente frágiles eritrocitos, ya sea durante la colecta o, con menor frecuencia, después de la flebotomía. Una causa poco común de hemólisis es cuando se lleva a cabo la flebotomía antes de que se seque el alcohol o cualquier otro desinfectante usado. Frecuentemente, la hemólisis es causada por un flujo turbulento no laminar, durante el proceso de colecta. Normalmente, la hemólisis no es causada por el uso de agujas muy grandes o muy pequeñas. El flujo no laminar ocurre comúnmente cuando la sangre se mueve muy lento o demasiado rápido a través de la aguja. Si la sangre se extrae con una jeringa, al sacar el émbolo con fuerza o al inyectar la sangre en los tubos usando presión en el émbolo, generalmente se produce hemólisis.

En forma similar, el flujo de sangre lento de una vena colapsada, que se deposita en un tubo con vacío, a menudo produce una muestra hemolizada. La turbulencia en un tubo que contiene sangre también puede causar hemólisis después de terminar la colecta; los transportadores mecánicos y las centrifugas en

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

Contaminación con fluidos intravenosos

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

d) Errores relacionados con la identificación del paciente y la muestra correspondiente

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

Causas de variación posteriores a la recolecta

Estas causas son más fácilmente controladas por el laboratorio que las variaciones relacionadas con la flebotomía. Lo anterior en virtud de que es posible desarrollar criterios para las condiciones aceptables de almacenamiento y manejo de mues-

tras después de la colecta, durante el tiempo en el que las muestras se encuentran en posesión del laboratorio. Dentro de las variables en el manejo de muestras que afectan los resultados de las pruebas se cuentan el transporte, la separación del suero de los elementos celulares y las condiciones de almacenamiento.

Transporte de las muestras

a) Errores relacionados con el transporte de muestras

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

b) Procedimiento para minimizar errores de transportación

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

Aunque el enfriamiento de las muestras durante su transporte minimiza muchos cambios artificiales en la concentración de los compuestos analizados, el enfriamiento también incrementa la liberación de potasio de las células. Para una sustancia que sufre cambios en la concentración debidos al metabolismo *in vitro*, debe indicarse un tiempo específico tolerable de retraso.

Procesamiento de muestras

Errores originados debido al procesamiento incorrecto de las muestras

La centrifugación es el método más común y usado para la separación inicial del suero y las células. En general, la centrifugación de muestras por 5 a 10 minutos a 1000-2000 G es adecuada para la completa separación del suero y los eritrocitos, incluyendo las muestras que contienen geles separadores de suero o plasma. Las muestras para obtener suero deben ser centrifugadas únicamente hasta que la formación del coágulo sea completa (al menos 20 a 30 minutos después de su colecta). Se debe tener la precaución de revisar que realmente el coágulo se haya formado, ya que puede haber razones fisiológicas para que ocurran tiempos prolongados de formación del coágulo. Por ejemplo, las muestras de pacientes de diálisis pueden continuar coagulándose por horas después de la colecta debido a la heparina empleada en la preparación de los pacientes para diálisis. Con tubos que no contienen geles separadores, es necesaria una etapa adicional para completar la separación. Antes de la centrifugación, los objetos tales como perlas de vidrio, tapones o cualquier otro objeto mecánico pueden ser adicionados a los tubos para realizar la misma función que el gel. El suero debe ser separado de las células, de otra manera, las células sanguíneas continuarán llevando a cabo sus funciones metabólicas y alterarán la composición del espécimen.

Almacenamiento de muestras

a) Errores originados debidos al almacenamiento inadecuado de muestras

Una vez que el suero o plasma ha sido separado de las células, la mayoría de las sustancias en un periodo de dos a tres días muestran pequeños cambios en la

concentración cuando se mantienen a 4°C. Para compuestos analizados lábiles, incluyendo, enzimas y algunas otras sustancias, las muestras deben ser congeladas para prevenir cambios relacionados con el almacenamiento. Los compuestos analizados, que pueden ser intrínsecamente estables en almacenamiento, también pueden cambiar en presencia de otros compuestos.

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

b) Procedimientos para minimizar errores por almacenamiento

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

Criterio para el rechazo de especímenes

Para evitar el reporte de resultados falsos, cada laboratorio debe establecer el criterio para el rechazo de especímenes. Un espécimen debe ser rechazado cuando

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

Etapas analíticas

En la fase analítica se realizan las mediciones y las observaciones en función de los procesos o protocolos que cubre el laboratorio. Cada procedimiento de análisis describirá no solo las mediciones y las observaciones implementadas en el laboratorio, sino también la verificación de las características de ejecución, que pretende la persona que elaboró el procedimiento o el fabricante del sistema analítico. La selección del procedimiento se basa en los criterios de practicabilidad y confiabilidad. Los aspectos de practicabilidad incluyen la educación y el entrenamiento requerido, la disponibilidad de los reactivos, los requerimientos instrumentales, el tiempo de ejecución, el costo y la seguridad. El personal encargado de elaborar los procedimientos con base en un estándar de operación, debe cuidar estos aspectos, al igual que la industria que los adapte a su versión comercial; es importante tenerlos en cuenta antes de seleccionar un procedimiento que vaya a implementarse en el laboratorio. Los criterios de confiabilidad describen la ejecución analítica del método cuando se utiliza en condiciones rutinarias, y son los siguientes: la exactitud en la ejecución, la precisión (expresada como una desviación estándar o coeficiente de variación), la veracidad (expresada como desviación), la linealidad, la especificidad analítica, la interferencia analítica, el límite de detección, el intervalo de medición y el error total.

Las características anteriores pueden variar de un laboratorio a otro, ya que la implementación de cada una de ellas modifica las condiciones óptimas. La etapa o fase analítica en química clínica también incluye otros aspectos como

la calibración, los estándares de calibración, los métodos de medición, la capacidad de rastrear los resultados para validarlos, los cálculos para los resultados, la utilización de curvas de medición, el uso de relaciones teóricas para algunas magnitudes, las transformaciones de resultados para hacerlos más informativos al médico, el uso de computadoras y analizadores, los procedimientos que permiten monitorear la ejecución de un procedimiento de medición con el propósito de una acción correctiva, el empleo de materiales o sueros de control y la preparación del mismo, el establecimiento de los límites de control, la realización de gráficas de control, la interpretación de las mismas, el uso de reglas de control, el archivo de todo lo relativo al control de calidad para posteriores requerimientos, entre otros aspectos.

Posanalítica

La preservación de la calidad posanalítica es el proceso para verificar la calidad en todos los procedimientos que se llevan a cabo cuando el reporte sale del laboratorio y queda en manos del médico o del profesional al cuidado de la salud.

Además de utilizar intervalos de referencia correctos, las áreas de preservación de la calidad posanalítica incluyen:

- La verificación de los cálculos en los reportes finales.
- La revisión de los resultados de la prueba para detectar posibles errores de transcripción.
- La presentación adecuada para facilitar la lectura y la interpretación de los reportes.
- Los procedimientos para informar al médico en el caso de resultados que requieran de atención inmediata.
- La vigilancia de que los valores se reporten en el expediente del paciente en el momento preciso.
- La verificación de que el médico interprete en forma correcta las pruebas de laboratorio.

- La interacción constante con el personal responsable de la institución a fin de asegurar que el paciente reciba cuidados directos de buena calidad como resultado de las pruebas de laboratorio.

En términos generales, la vigilancia de esta parte de la preservación de la calidad se realiza de dos maneras. En primer lugar, estas observaciones suelen relacionarse con reportes de laboratorio incorrectos o cuando transcurre demasiado tiempo desde que se solicita la prueba de laboratorio hasta que se reciben los resultados finales. El otro tipo de vigilancia de la calidad en esta área se practica mediante la valoración continua del impacto de los resultados y procedimientos del laboratorio dentro de la institución en la cual brinda sus servicios. El objetivo de estas valoraciones continuas es promover la excelencia en los cuidados para los pacientes, a través de las relaciones humanas con todos los departamentos de la institución.

Los programas de preservación de la calidad institucional toman la forma de círculos de calidad, comités para preservación de la calidad o comités revisores. El objetivo de estos grupos no es resolver problemas sino evitar que ocurran. Además, es necesario que el laboratorio tenga algún método para preservar en forma continua la calidad, verificando periódicamente su capacidad para funcionar como un departamento de buena calidad. Esto puede incluir la evaluación de los espacios disponibles en el laboratorio para asegurar eficacia en los servicios, revisar el grado de preparación del personal y apoyarlo para que participe en actividades de actualización de conocimientos y formación profesional.

El personal de laboratorio en su conjunto es responsable de que se preserve la calidad dentro del mismo. Se trata de una forma de convivencia y una actitud que deben ser evidentes en todos los niveles de práctica. La calidad debe extenderse más allá de los confines físicos del laboratorio, pues también incluye la responsabilidad de los servicios hacia cualquier médico que ordene una prueba, así como una preocupación y compromiso permanente para que el paciente reciba un tratamiento eficaz como resultado de los datos que arroja el laboratorio. Una vez que se asegure la calidad de los estudios en cada una de las etapas

anteriores, se podrán obtener resultados concretos y con bases sólidas; entonces podrá afirmarse que se cuenta con un laboratorio con una adecuada estructura operativa y administrativa.

NOTA: Esta práctica es de tipo teórico, por lo que no aplican los apartados de materiales y métodos.

UNIDAD 2. LEGISLACIÓN DE LABORATORIO CLÍNICO

PRÁCTICA 2 LEGISLACIÓN DE LABORATORIO CLÍNICO

DURACIÓN: 2 HORAS

Objetivos

- Conocer los procedimientos para el manejo de RPBI de acuerdo con la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 para que el estudiante aprenda a eliminarlos de la manera correcta.
- Conocer la organización del laboratorio de Bioquímica Clínica de acuerdo con la NOM-007-SSA3-2011 para que la aplique correctamente.

Materiales y métodos

Esta práctica es de tipo teórico, por lo que es necesario consultar las siguientes normas oficiales mexicanas: 1) Protección ambiental-salud ambiental-residuos peligrosos biológico-infecciosos-clasificación y especificaciones de manejo: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/680173/NOM-087-ECOL-SSA1-2002.pdf>, y 2) Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/512099/NOM-007-SSA3-2011.pdf>

NOTA: Esta práctica es de tipo teórico, por lo que no aplican los apartados de materiales y métodos.

UNIDAD 3. DIAGNÓSTICO DE ALTERACIONES EN LA GLUCOSA SANGUÍNEA

PRÁCTICA 3

DETERMINACIÓN DE GLUCOSA SANGUÍNEA MÉTODO ENZIMÁTICO (GOD-PAD)

DURACIÓN: 40 MINUTOS

Objetivos

- Argumentar la importancia de la glucosa en el metabolismo humano y con el fin de relacionarla con diversas patologías.
- Medir la concentración de glucosa en estado basal en una muestra biológica utilizando un método enzimático para conocer el estado que guarda el paciente.

Generalidades

La glucosa, la fructosa y la galactosa son los carbohidratos, producto final de la degradación durante la digestión. La fructosa y la galactosa son transformadas en glucosa en el hígado. Toda la glucosa que no se utilice va a ser fosforilada a glucosa 1-fosfato y será almacenada como glicógeno. La principal función bioquímica de la glucosa es la de proporcionar energía en forma de adenosín trifosfato (ATP) para los procesos de la vida. El ATP es la fuente de energía universal para las reacciones biológicas. La oxidación de la glucosa por las vías glucolítica y del ácido cítrico es la fuente principal de energía para la biosíntesis del ATP. El sistema para regular los niveles de glucosa sanguínea funciona para lograr dos fines. El primero

es para almacenar glucosa en exceso en relación con las necesidades corporales inmediatas en un reservorio compacto (glucógeno) y el segundo es para movilizar la glucosa almacenada de manera que mantenga el nivel de glucosa sanguínea. La regulación de la glucosa sanguínea es esencial para mantener al cerebro, cuya fuente energética primaria es la glucosa, abastecida por una cantidad constante de la misma. La función de la insulina es desviar la glucosa extracelular a los sitios de almacenamiento intracelular en forma de macromoléculas (como glucógeno, lípidos y proteínas). De esta forma, la glucosa es almacenada en tiempos de abundancia para los momentos de necesidad. En respuesta a la baja glucosa en sangre, como en periodos de ayuno, una serie de agentes hiperglucemiantes actúa en las vías metabólicas intermediarias para formar glucosa a partir de las macromoléculas almacenadas. De esta manera, las proteínas y el glucógeno son metabolizados para formar glucosa-6-fosfato (gluconeogénesis), la cual es hidrolizada a glucosa en el hígado y liberada a la sangre para mantener los niveles de glucosa sanguínea. Los agentes hiperglucemiantes más importantes son el glucagón, la epinefrina, el cortisol, la tiroxina, la hormona de crecimiento y ciertas hormonas intestinales. El comportamiento de cada uno de estos agentes es diferente en la regulación de la glucosa sanguínea, mientras que la insulina favorece el metabolismo anabólico (síntesis de macromoléculas). Estas hormonas, en parte, inducen el metabolismo catabólico para romper grandes moléculas.

Glicemia es el nombre con el que se denomina la concentración normal de glucosa en sangre. La hiperglucemia se presenta cuando se tiene un exceso de glucosa en la sangre, por arriba del límite superior normal para una edad. Cuando los niveles son inferiores se denomina hipoglucemia.

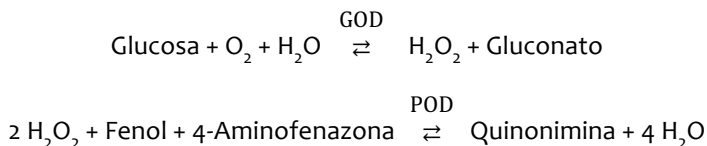
Aunque, con suma frecuencia, los valores altos de glucosa sérica en ayunas se relacionan con la presencia de diabetes sacarina, el número de enfermedades y trastornos fisiológicos que pueden llevar a incrementos mayores es vasto. El aumento de la concentración de glucosa sérica se da en respuesta a la tensión, la enfermedad de Cushing, la diabetes mellitus, la acromegalia, el hipertiroidismo, la pancreatitis crónica y/o a la administración de algunos fármacos como diuréticos clorotiacídicos, porque suprimen la secreción de insulina, coma hiperosmolar no cetósico. La hipogluce-

mia se presenta en enfermedad hepática, desnutrición, posgastrectomía, tolerancia deficiente a la glucosa, administración excesiva de insulina, hipoglucemia funcional o espontánea o ingestión de alcohol en ayunas, entre otros trastornos. Debido a que la concentración de glucosa sérica, por lo general, se vuelve anormal solo cuando hay un trastorno grave de esta interacción, verificar la glucosa sérica ayuda a evaluar la función e integridad del sistema. La prueba de glucosa en ayunas evalúa, de modo aproximado, la capacidad del cuerpo para regular la glucosa y proporciona información acerca del tipo de anormalidad, si es que existe. No se tomarán alimentos ni bebidas, excepto agua, cuando menos durante ocho horas antes de tomar la muestra.

Las técnicas utilizadas para determinar glucosa en un inicio eran inespecíficas, debido a que había interferencias químicas por sustancias reductoras diferentes a la glucosa. Durante muchos años se utilizó el método de la O-toluidina (amina aromática primaria) que reaccionaba casi en forma selectiva con la glucosa. Sin embargo, este originaba la eliminación de un gas que con el tiempo se confirmó que era cancerígeno y, aunque su costo es muy bajo, dejó de utilizarse.

Existen métodos muy exactos como la Glucosa Deshidrogenasa o la Hexocinasa; pero su alto costo se usa casi exclusivamente para la investigación. La glucosa oxidasa se descubrió en el año 1928 por Müller y, en 1954, Keilin y Harteis la utilizaron para determinar glucosa en materiales biológicos. En 1956, Keston propuso el sistema glucosa-oxidasa-peroxidasa.

El método utilizado para fines diagnósticos es el de Glucosa-Oxidasa. La enzima gluco-oxidasa cataliza la oxidación de glucosa a gluconato y peróxido de hidrógeno. La concentración de glucosa es proporcional al H_2O_2 , el peróxido en presencia de fenol y 4-aminofenazona origina el colorante rojo violeta de antipirrolquinonimina; el color es proporcional a la concentración de glucosa presente. La determinación de glucosa se efectúa mediante el método de Trinder, según las siguientes reacciones:



Abreviaturas: GOD = Glucosa oxidasa; POD = Peroxidasa.

Materiales

Material biológico

- Suero o plasma venoso.
- La muestra debe recolectarse en ayuno, excepto de agua, durante ocho horas antes de la prueba.
- La muestra debe recolectarse en tubo colector de tapón rojo para suero, el cual no contiene anticoagulante; o de color lila, el cual contiene EDTA anticoagulante para obtener plasma.
- La muestra debe centrifugarse a 3 500 rpm durante cinco minutos para separar suero y plasma.
- La glucosa en suero o plasma es estable al menos tres días a 2-8°C.
- La muestra deberá centrifugarse lo más pronto posible para separar el suero o el plasma del paquete globular.

NOTA: Los anticoagulantes de uso corriente, como la EDTA, oxalato, heparina o fluoruro no afectan los resultados. La hemólisis hasta 0,3 g/dL de hemoglobina no interfiere.

La muestra es inaceptable:

- Si el suero se obtiene turbio.
- Si la identificación es inadecuada.
- Si el tubo de recolección no es el adecuado.
- Cuando se haya excedido el tiempo máximo de análisis permisible.
- No se han observado interferencias por hemoglobina (4 g/L); bilirrubina (20 mg/L); creatinina (100 mg/L); galactosa (1 g/L).

Material de laboratorio

- Tubos de ensaye de 13 x 100 mm
- Micropipetas de 1.0 mL

- Micropipeta de 10 mL
- Puntas para micropipeta
- Gradilla

Equipos

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas de 490-550 nm
- Centrífuga

Medidas de seguridad y salud ocupacional

Ver Anexo 1.

PRÁCTICA 4

PRUEBA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA VÍA ORAL, DOSIS ÚNICA

DURACIÓN: 2.5 HORAS

Objetivo

Determinar la concentración de glucosa durante un estímulo por glucosa oral, dosis única y posprandial, en una muestra biológica mediante el método enzimático glucosa-oxidasa para conocer los niveles de glucosa en los diferentes tiempos, en un paciente.

Generalidades

La prueba de tolerancia a la glucosa es una prueba natural, que permite establecer la respuesta insulínica frente a un estímulo fisiológico por glucosa. Las personas sanas metabolizan la glucosa a mayor velocidad que los enfermos diabéticos; estos tienen falta total o parcial de insulina o de su efecto biológico, lo que ocasiona que los niveles de hiperglucemia, después de ingerir glucosa, sean mayores y persistan más tiempo que en las personas con un metabolismo normal. La rápida absorción de la glucosa provoca elevación del CHO en sangre, lo que desencadena la liberación de insulina (preformada en las células beta) en cantidad suficiente para cubrir las necesidades, es decir, aumentar la captación de la glucosa por los tejidos, en especial el hígado, donde se almacena en forma de glucógeno. En un sujeto sano, el nivel máximo de glucosa después de la absorción rara vez sobrepasa de 150 mg/dL. Las cifras normales se recuperan generalmente antes de dos horas y, desde luego, antes de tres horas contadas a partir de la ingestión de glucosa.

El fundamento es establecer la capacidad que tiene el organismo de un individuo para metabolizar una dosis fija de glucosa administrada por vía oral. Su objetivo es diagnosticar o descartar diabetes u otros cuadros relacionados con resis-

cia a la insulina. Los métodos más comúnmente utilizados para evaluar la tolerancia a una sobrecarga de glucosa pueden ser 1) Pruebas de tolerancia utilizando una dosis única oral de glucosa y 2) Pruebas de tolerancia con una dosis intravenosa de glucosa.

La prueba más común de tolerancia a la glucosa es la oral. Después de una noche de ayuno (8 a 14 horas), se toma una muestra de sangre dos horas después de ingerir una carga oral de 75 g de glucosa. Las mediciones intermedias no se realizan de manera rutinaria, a menos que sea solicitado por el médico. Por este motivo, se eliminó el término “curva de tolerancia a la glucosa”. Además, el paciente no puede comer durante el examen y se recomienda informar al médico acerca del uso de medicamentos que pueden afectar los resultados del examen. Con frecuencia, se solicita la medición de los niveles de insulina (hormona producida por el páncreas que permite introducir la glucosa desde la sangre hasta cada una de las células del cuerpo). Cuando se suministra la glucosa por la boca, la absorción desde el tracto gastrointestinal hacia la sangre continúa durante un lapso variable, que depende de la cantidad de glucosa suministrada. La máxima absorción de glucosa se estima en 0,8 g/kg de peso por hora.

La tolerancia a la glucosa, suministrada por vía oral, mide el balance entre la velocidad de pasaje de la glucosa al fluido extracelular y su separación por la asimilación celular y la excreción urinaria, si la hubiere. Por tanto, la prueba puede influirse no solo por aquellos factores vinculados con la utilización de la glucosa, sino también por los que influyen en su absorción. Las pruebas intravenosas de tolerancia a la glucosa son poco comunes. Para realizar este tipo de prueba, al paciente se le inyecta por vía venosa una cantidad conocida de glucosa durante tres minutos, previa la medición de los niveles de insulina en la sangre, en el minuto uno y en el minuto tres.

Materiales

Material biológico

- Suero o plasma venoso

Equipos

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

Material de laboratorio

- Tubos de ensaye de 13 x 100 mm
- Micropipetas de 1.0 mL
- Micropipeta de 10 mL
- Puntas para micropipeta
- Gradilla

Métodos

El protocolo correcto para la administración de la Prueba de tolerancia oral a la glucosa es el siguiente:

Condiciones del paciente

- La persona come normalmente durante tres días que preceden la prueba, sin restricción de carbohidratos (CHO), pero integrará a uno de esos días un total de 100 g de glucosa, lo que se consigue comiendo al final de sus comidas un pan dulce con mantequilla y abundante mermelada o cajeta.
- La persona no come ni toma nada (excepto el agua en razonables cantidades), durante un periodo de entre 8 y 12 horas antes de la prueba.
- La persona debe descansar (no estar activa) durante las 2 horas de la prueba.
- La persona no debe fumar durante las horas de ayuno ni durante las 2 horas de la prueba.
- Otros factores pueden distorsionar el poder diagnóstico de la prueba y deben evitarse: inactividad física severa en las semanas anteriores a la prueba, estar obligado a estar en cama durante varios días anteriores a la prueba, estrés médico (enfermedad) o quirúrgico, así como algunas drogas (tiazidas, β -bloqueadores, glucocorticoides, fenitoina).

Procedimiento correcto aceptado para la Prueba de tolerancia oral a la glucosa

- La Prueba de tolerancia oral a la glucosa debe administrarse en las horas matutinas (antes de las 12 horas).
- Se toma una muestra de sangre en ayunas.
- La persona tiene que tomar vía oral toda la glucosa anhidra (400 mL de agua de limón con 75 g de glucosa anhidra) en un periodo menor de cinco minutos.
- Dos horas después de iniciar la ingesta de la glucosa anhidra, se toma la segunda muestra de sangre. El resultado de glucosa sanguínea de esta muestra se utiliza para el diagnóstico de la diabetes mellitus (DM).

Glucosa-Oxidasa es el método recomendado para la determinación

Algunos estudios utilizan pruebas iniciales a -10 minutos (en ayunas, 10 minutos antes de tomar la glucosa anhidra) y a 0 (cero) minutos (al momento en que la persona empieza a tomar la glucosa anhidra). En otros estudios, realizan siete medidas de la glucosa sanguínea en 2 horas, u 11 medidas de la glucosa sanguínea en 5 horas, o hasta 21 medidas de la glucosa sanguínea en 7 horas. El procedimiento estándar es de una medición (a 2 horas de haber empezado a tomar la glucosa anhidra líquida) o de dos mediciones (en ayuno y a 2 horas después de haber empezado a tomar la glucosa anhidra líquida). Así, no es obligatorio hacer las dos mediciones, pero la primera (en ayuno) puede ser útil para determinar la presencia de hiperglucemia. En cuanto a los riesgos y a los síntomas que pueda presentar una persona, si se le administra una carga de glucosa oral, sin conocer su valor de glucemia previa a la prueba, serán pocos. El riesgo principal sería elevar aún más la glucosa sanguínea, que ya está anormalmente alta. Cada gramo de glucosa sube la glucosa sanguínea aproximadamente 5 mg/dL. Así, los 75 gramos de glucosa anhidra podrían adicionar 375 mg/dL de glucosa sanguínea al valor inicial (suponiendo la ausencia de insulina suficiente). Por eso, esta prueba está contraindicada para personas que, clara u obviamente, tienen DM.

La Asociación Mexicana de la Diabetes (ADA) recomienda el uso de la Prueba de tolerancia oral a la glucosa, principalmente, en casos inciertos; por ejemplo, un día la glucemia está elevada en ayunas, el siguiente día es normal en ayunas. Si la persona ya tiene niveles elevados (más de 125 mg/dL en ayuno), solo se esperaría un día más para monitorear otra vez la glucosa en ayuno, para confirmar el diagnóstico de DM. Si la persona ya tiene niveles muy elevados (200 mg/dL o más) de glucemia, la prueba en ayunas o al azar también lo indicará y no será necesario proceder con la Prueba de tolerancia oral a la glucosa, porque junto con los síntomas de DM, un nivel de 200 mg/dL equivale al diagnóstico de la DM.

La presencia de grandes cantidades de cetonas (++ ó +++ ó ++++) o de cetoacidosis sería una contraindicación al uso de la prueba de tolerancia oral a la glucosa. Normalmente, para que haya cetoacidosis, la glucosa sanguínea debe estar elevada (resultado de insuficiente insulina en el cuerpo y resultado prácticamente idéntico con el diagnóstico de DM). El diagnóstico de DM gestacional utiliza una frecuencia distinta de medición glucémica durante la prueba y valores diagnósticos distintos.

Intervalos de referencia

Después de 2 horas de haber tomado la dosis de glucosa, los siguientes resultados indican el diagnóstico:

Niveles de glucosa en sangre (Glucemia)	Diagnóstico
Menor a 140 mg/dL	Normal
Entre 140 y 200 mg/dL	Prediabetes, intolerancia a la glucosa o resistencia a la insulina.
Mayor a 200 mg/dL	Signos de diabetes mellitus.

Los criterios utilizados para definir la condición de anormalidad de una curva de tolerancia se basan en el nivel o pico elevado alcanzado por la concentración san-

guínea y la falta de retorno al nivel normal, dos horas después de la ingestión de glucosa, siendo este último el más importante.

Un valor hipoglucémico (bajo de glicemia), de tres a cinco horas después de la ingestión de la glucosa, se observa en ciertos pacientes cuya curva de tolerancia era de tipo diabético, interpretándose un hiperinsulinismo, típico del estado diabético. En personas con tolerancia normal a la glucosa, la glucemia no suele sobrepasar los 7,8 mmol/l (140 mg/dL) como respuesta a las comidas y, por lo general, regresa a los niveles previos a dos o tres horas. La Organización Mundial de la Salud define como tolerancia normal a la glucosa una medición de <7,8 mmol/l (140 mg/dL) a las dos horas de ingerir una carga de glucosa de 75 g, dentro del contexto de una prueba oral de tolerancia a la glucosa. En esta guía, se define como hiperglucemia posprandial a un nivel de glucosa en plasma >7,8 mmol/l (140 mg/dL) a las dos horas de haber ingerido alimentos.

Resultado

Medidas de seguridad y salud ocupacional

Ver Anexo 1.

PRÁCTICA 5

LA GLUCOSA POSTPRANDIAL

DURACIÓN: 40 MINUTOS

Objetivo

- Determinar la concentración de glucosa postprandial en una muestra biológica mediante el método enzimático Glucosa-Oxidasa para descartar estados de hiperglucemia.

Generalidades

La glucosa posprandial se define como glucosa después de comer. Se encuentra influenciada por diversos factores: la glicemia basal, la cantidad y la composición de los alimentos, el grado de absorción de los carbohidratos y la secreción de insulina y glucagón. En pacientes no diabéticos, la glucosa después de dos horas de ingestión retorna a los valores basales. En pacientes con diabetes mellitus tipo 2, debido al retardo en el pico de insulina, las excursiones glicéricas son mayores y más largas, encontrándose el pico glicémico a las dos horas de inicio de la ingesta. En diabéticos tipo 1, la prueba está influenciada por el régimen de insulina del paciente.

La razón fundamental para la determinación de la glicemia es el diagnóstico de una serie de alteraciones metabólicas que comparten el fenotipo de hiperglicemia y se denomina diabetes mellitus. La otra razón importante para determinar glicemia es el diagnóstico de hipoglicemia, la cual se produce por diversas causas, pero en general, si no es bien manejada, aumenta las posibilidades de desarrollar diabetes mellitus. Esta prueba no se considera como criterio para el diagnóstico de la diabetes mellitus por su falta de estandarización y de criterios por las organizaciones que controlan los estándares de diabetes y su diagnóstico en el mundo. Más bien, su utilidad es para diagnosticar una hiperglucemia posprandial, ya que esta tiene grandes repercusiones en el diabético.

Materiales

Material biológico

- Suero o plasma venoso

Equipos

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas de 490-550 nm
- Centrífuga

Material de laboratorio

- Tubos de ensaye de 13 x 100 mm
- Micropipetas de 1.0 mL
- Micropipeta de 10 mL
- Puntas para micropipeta
- Gradilla

Métodos

Condiciones del paciente

- La persona come normalmente durante los tres días que preceden la prueba; restricción de carbohidrato (CHO) durante los tres días anteriores a la prueba distorsionará sus resultados.
- La persona no come ni toma nada (excepto el agua en razonables cantidades) durante las 8-12 horas antes de la prueba.
- La persona debe descansar (no estar activa) durante las dos horas de la prueba.
- La persona no debe fumar durante las horas de ayuno ni durante las dos horas de la prueba.
- Otros factores pueden distorsionar el poder diagnóstico de la prueba y deben evitarse: inactividad física severa en las semanas anteriores a la prueba, estar obligado a estar en cama durante varios días anteriores a la prueba, estrés

médico (enfermedad) o quirúrgico, algunas drogas (tiazidas, β -bloqueadores, glucocorticoides, fenitoina).

Prueba

- Tomar una muestra al paciente en ayuno.
- Indicar al paciente que desayune alimentos ricos en carbohidratos en un desayuno promedio.
- Deberá regresar al laboratorio exactamente 10 minutos antes de que se cumplan dos horas de haber iniciado la ingesta de alimentos.
- A las dos horas exactas del inicio del consumo de alimentos, tomar la muestra sanguínea
- Determinar mediante el método de Glucosa-Oxidasa.

Resultado

Otras metodologías para detectar diabetes

a) Monitorización Continua de la Glucosa

La Monitorización Continua de la Glucosa (MCG) es una tecnología de aparición reciente para la monitorización de la diabetes. La MCG utiliza un sensor, un dispositivo de almacenamiento de datos y un monitor. El sensor mide la glucosa con una frecuencia de entre 1 y 10 minutos y transmite los resultados a un dispositivo de almacenamiento de datos. El médico puede descargar los resultados retrospectivamente o puede verlos en tiempo real en el monitor. La MCG aporta información sobre los niveles, patrones y tendencias de la glucemia, reflejando así los

efectos de la medicación, el estrés, el ejercicio y otros factores que influyen sobre los niveles de glucosa. Debido a que los mecanismos de MCG miden la glucosa intersticial, los valores de análisis llevan un retraso de varios minutos respecto a las mediciones en un punto del tiempo.

b) 1,5-anhidroglucitol

El 1,5-anhidroglucitol (1,5-AG) en plasma, un poliol alimentario que se produce de manera natural, se ha propuesto como marcador de hiperglucemia posprandial. Debido a que el 1,5-AG es sensible y responde rápidamente a los cambios de la glucosa en suero, refleja con exactitud las elevaciones transitorias de la glucosa en unos pocos días. Un ensayo automatizado con 1,5-AG se ha utilizado en Japón durante más de una década; en los Estados Unidos se ha aprobado recientemente un ensayo similar. No hay estudios de resultados referentes al uso de esta medida del control glucémico.

Medidas de seguridad y salud ocupacional

Ver Anexo 1.

UNIDAD 4. VALORACIÓN DE LA FUNCIÓN RENAL

PRÁCTICA 6 **DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ÚRICO** **MÉTODO URICASA**

DURACIÓN: 40 MINUTOS

Los compuestos nitrogenados no proteicos comparten la naturaleza de ser productos de desecho del organismo y, como su nombre lo indica, no son proteínas. Estos son el ácido úrico proveniente de las bases púricas, la urea proveniente de las proteínas y la creatinina que deriva de la fosfocreatina. Por ser productos de desecho, tienen que llegar a órganos capaces de eliminarlos y, por lo tanto, estos órganos podrán ser evaluados en su función al permitir la eliminación total de estos productos. Así es que tienen en común la evaluación de la función renal, ya que es el riñón el órgano encargado de su eliminación. Sin embargo, algunos de ellos también tendrán otros fines diagnósticos.

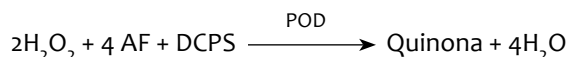
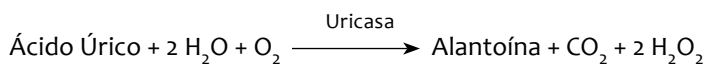
Objetivos

- Conocer la metodología enzimática colorimétrica para la determinación de ácido úrico para aplicarla correctamente en una muestra biológica.
- Conocer los intervalos de referencia de ácido úrico para compararlos con el valor de nuestra muestra problema a analizar.

Generalidades

El ácido úrico en los mamíferos es el metabolito final del catabolismo de los ácidos nucleicos, específicamente de la adenina y la guanina (endógeno y exógeno), se sintetiza en el hígado y una pequeña parte en el intestino delgado. Se elimina aproximadamente 75% por vía renal y el resto se libera al tracto gastrointestinal, donde es degradado por la flora bacteriana. Su elevación está asociada a la gota, es decir, los reumatismos hiperuricémicos. En los pacientes con tal disfunción, aparecen cristales de ácido úrico en las articulaciones y en los tendones, lo que origina las manifestaciones reumáticas características. Niveles altos de ácido úrico también están asociados a patología renal por retención de productos nitrogenados, asociándose en estos casos a valores también altos de urea y de creatinina. Se eleva en procesos con aumento en la síntesis de purinas, problemas nutricionales, recambio de ácidos nucleicos, como la proliferación de células tumorales, leucemias, soriasis, drogas citotóxicas, fallo renal, etc. La disminución es menos frecuente.

Folin y Denis realizaron la determinación de ácido úrico como urato de plata de un filtrado libre de proteínas y utilizando carbonato como reactivo alcalino, el cual posteriormente fue sustituido por cianuro, para mejorar la sensibilidad. Caraway introduce el uso de carbonato para mejorar la alcalinidad y el ácido fosfotúngstico para impedir el enturbiamiento. Brown utiliza cianuro y uricasa. La uricasa, debido a su marcada especificidad, se ha utilizado desde hace mucho tiempo para cuantificar el ácido úrico sanguíneo. El principio del método de la uricasa se basa en que el ácido úrico es oxidado por la uricasa a alantoína y peróxido de hidrógeno que –en presencia de peroxidada (POD) y 4-aminofenazona (4-AF) y 2, 4, diclorofenol sulfonato (DCPS)– forma un compuesto rosáceo.



Materiales

Material biológico

- Suero: plasma de pacientes con ocho horas de ayuno. Muestra de orina de 24 horas.
- Orina: diluir la orina al 1:10 con agua destilada, mezclar y seguir la técnica. Multiplicar el resultado por 10.

Material de laboratorio

- 1 Micropipeta de 1,000 μL
- 1 Micropipeta de 50 μL
- 1 Piseta con agua desionizada o destilada
- 2 Celdas de plástico de 3 mL
- 4 Tubos de vidrio de 13 x 100 Puntas para micropipeta
- Gradilla

Métodos

Reactivos, procedimiento, condiciones de ensayo y desarrollo de la práctica, tomarlo del inserto del kit. Ver Anexo 5.

Medidas de seguridad y salud ocupacional

Ver Anexo 1.

PRÁCTICA 7

DETERMINACIÓN DE CREATININA

MÉTODO JAFFE

DURACION: 40 MINUTOS

Objetivos

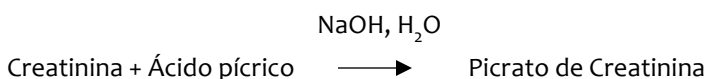
- Conocer la metodología de Jaffe para la determinación de creatinina para aplicarla correctamente en una muestra biológica.
- Establecer los intervalos de referencia de la creatinina para compararlos con el valor de nuestra muestra problema a analizar.

Generalidades

La creatinina es un producto final del metabolismo muscular. Se origina a partir de la creatina por pérdida de una molécula de agua. A su vez, la creatina se produce por hidrólisis del fosfato de creatina, por acción de la creatin-fosfo-kinasa (CPK), apareciendo como metabolitos de dicha reacción el fosfato energético y la creatina. El radical fosfato puede aportar energía directamente por dicha reacción o a través de su acoplamiento a una molécula de ADP para formar ATP y posterior hidrólisis por acción de ATPasa. La eliminación de creatinina en el cuerpo humano tiene lugar casi exclusivamente a través de la filtración glomerular, siendo un importante índice del funcionamiento renal. A diferencia de la urea, la eliminación de creatinina por la orina no viene afectada por la diuresis, al mismo tiempo que para una misma persona es muy constante su eliminación diaria casi con independencia de la dieta alimenticia, siendo la masa muscular el factor condicionante más directo de su excreción total por día. En resumen, podemos decir que la eliminación de creatinina en un intervalo de 24 horas es un valor constante, dependiente principalmente de la masa muscular del individuo. Por otro lado, el cálculo del aclaramiento de la creatinina será un parámetro directo del funcionamiento

renal. A medida que la función renal disminuye, la creatinina aumenta; tiene particular interés diagnóstico y pronóstico en los casos de nefropatías, obstrucciones urinarias y miopatías.

Este método fue desarrollado por Jaffe en 1886; la reacción química se basa en el desarrollo de color amarillo-anaranjado que se produce al reaccionar la creatinina con el picrato alcalino. Hay varias sustancias en el suero y en la orina que actúan como cromógenos inespecíficos (glucosa, ácido ascórbico, piruvato, ácido úrico, bilirrubinas, etc.). Al reaccionar con el picrato alcalino, la mayoría de ellos provocan interferencia en función de la temperatura. Sin embargo, solo concentraciones elevadas de estos cromógenos provocan interferencia significativa. Por este motivo, tiene una gran importancia la adecuación de todas las variables de la reacción, muy especialmente el pH, con el fin de obtener la máxima sensibilidad para la creatinina y la mínima interferencia de cromógenos. Adaptando la reacción a una medida cinética, se logra una gran especificidad debido a que la creatinina reacciona con el picrato alcalino con más rapidez que los cromógenos (metilguanidina, picramato), por lo que la medida del incremento de color en un breve periodo inicial de la reacción valorarán principalmente creatinina, con poca influencia de los cromógenos inespecíficos, por esto es recomendable, de ser posible, la determinación cinética.



Materiales

Material biológico

- Suero o plasma heparinizado o con fluoruro de un paciente con ayuno de 8 horas. La creatinina en suero y plasma tiene una estabilidad al menos de 24 horas a una temperatura entre 2-8°C.
- Orina de 24 horas. Diluir previamente a 1:50 con agua destilada, multiplicar el resultado por 50.

Material de laboratorio

- 1 Micropipeta de 1,000 μL
- 1 Micropipeta de 200 μL
- 1 Pisseta con agua desionizada o destilada
- 2 Celdas de plástico de 3 mL
- 5 Tubos de vidrio de 13 x 100 mm
- Puntas para micropipeta
- Gradilla.

Equipo

- Espectrofotómetro o fotómetro termostable a 37°C con filtro de 490-510 nm
- Centrífuga

Medidas de seguridad y salud ocupacional

Ver Anexo 1.

PRÁCTICA 8

DETERMINACIÓN DE UREA

MÉTODO CINÉTICO UREASA

DURACIÓN: 40 MINUTOS

Objetivos

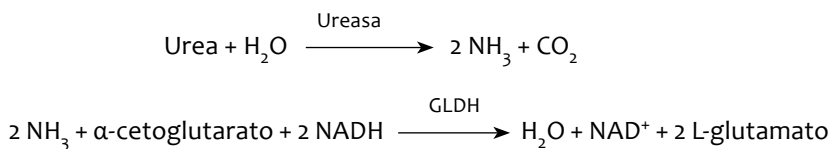
- Conocer el fundamento de la determinación de urea por el método de la ureasa para aplicarlo adecuadamente en una muestra biológica.
- Establecer los intervalos de referencia de la urea y compararlos con el valor de la muestra problema a analizar.

Generalidades

La urea es el principal producto final del metabolismo de las proteínas, se deriva fundamentalmente a partir de los grupos amino de los aminoácidos. El hígado es el órgano más importante en la síntesis de la urea a través del ciclo de la ornitina. Una vez formada la urea en el hígado, pasa a la sangre y es excretada en la orina. El nitrógeno ureico depende de la relación entre la producción de urea y su excreción. El amoniaco que se origina del catabolismo de las proteínas, para posteriormente convertirse en urea en el hígado, es superior en los infantes que en los adultos, debido a que el desarrollo de la circulación hepática se termina después del nacimiento. La hiperamonemia es una entidad que se presenta con frecuencia debido a defectos congénitos en el ciclo de la urea. El error innato del metabolismo más común es la deficiencia en ornitina transcarbamilasa. La hiperalimentación es una causa mucho más frecuente de hiperamonemia en infantes. Con frecuencia, se diagnostica el síndrome de Reye por un amoniaco sanguíneo elevado en ausencia de otra causa demostrable. Los pacientes adultos muestran elevadas concentraciones de amoniaco sanguíneo en las etapas terminales de cirrosis hepática, falla hepática y necrosis del hígado, aguda y subaguda. Se presagia el comienzo de la

encefalopatía hepática por una elevación en el amoníaco sanguíneo. Puesto que la urea se sintetiza en el hígado, en la enfermedad hepática sin daño en la función renal, se presenta nitrógeno ureico sérico bajo, aunque la relación urea a creatinina se puede conservar normal. La elevación en el nitrógeno ureico sérico no implica necesariamente daño renal, puesto que la deshidratación puede llevar a concentraciones de nitrógeno ureico tan altas como 600 mg/L. Los infantes que reciben una fórmula alta en proteínas pueden tener niveles de nitrógeno ureico de 250 a 300 mg/L. Naturalmente, enfermedades como la glomerulonefritis aguda, la nefritis crónica, el riñón poliquístico y la necrosis renal elevan el nitrógeno ureico. La concentración de urea aumenta en la sangre por causas 1) prerrenales: deshidratación y aumento en el catabolismo de proteínas; 2) renales: glomerulonefritis, necrosis tubular; 3) causas posrenales: obstrucciones del tracto urinario provocados por cálculos, glándula prostática dilatada, tumores, etcétera.

La urea del suero puede determinarse cuantitativamente en dos formas: 1) método directo, haciendo reaccionar a la diacetilmonoxima con la urea formando un complejo colorido, 2) método indirecto, desdoblando la urea con ureasa, enzima específica y midiendo el amoníaco producido por hidrólisis. La ureasa cataliza la hidrólisis de la urea dando amoníaco y CO₂. El amoníaco formado se valora mediante una reacción enzimática Glutamato deshidrogenasa (GLDH), pasando NADH a NAD⁺. La disminución de la absorbancia frente al tiempo es proporcional a la concentración de urea.



Metodología

Material biológico

Suero o plasma heparinizado de un paciente con ayuno de ocho horas.

Material

- 1 Micropipeta de 1,000 μL
- 1 Micropipeta de 200 μL
- 1 Piseta con agua desionizada o destilada
- 2 Celdas de plástico de 3 mL
- 5 Tubos de vidrio de 13 x 100 mm
- Gradilla

Equipo

- Espectrofotómetro o fotómetro termostable a 37°C con filtro de 340 nm
- Centrífuga

Medidas de seguridad y salud ocupacional

Ver Anexo 1.

PRÁCTICA 9

QUÍMICA SANGUÍNEA

DURACIÓN: 2 HORAS

Objetivo

- Desarrollar las técnicas que integran la determinación de glucosa, urea, creatinina y ácido úrico para la determinación de la química sanguínea.

Generalidades

Bajo este título se agrupan una serie de determinaciones que indican el contenido de los metabolitos en sangre.

Glucosa

Mide la cantidad de la glucosa en la sangre. Valor normal 70-109 mg/dL. Valor alto, más de 120 mg/dL, puede indicar diabetes, enfermedades renales, hipertiroidismo, pancreatitis aguda, tumores de páncreas. Valores bajos, menos de 60 mg/dL, puede indicar hipoglicemia, exceso de insulina, hipotiroidismo.

- BUN: nitrógeno ureico en sangre. Se mide para evaluar la función renal y ver el nivel de nitrógeno en la sangre. Valor normal: 8-26 mg/dL. Valor elevado: puede deberse a deshidratación o deficiencia renal o cardíaca.
- UREA: valor normal: 20 40 mg/dL. Representa la cantidad de urea en la sangre.
- ACIDO ÚRICO: valor normal: 3,4-7 mg/dL. Valor elevado: puede indicar acidosis metabólica, diabetes, alcoholismo, elevación de purinas (carnes rojas, vísceras animales, embutidos, mariscos, frutos secos). Valor bajo: puede indicar poco consumo de purinas, síndrome de Faconi (es un trastorno de los túbulos

renales en el cual ciertas sustancias normalmente absorbidas y devueltas al torrente sanguíneo por los riñones son liberadas en su lugar en la orina.)

- **CREATININA:** indica la función renal según el producto de degradación de la creatinina, que es un elemento constitutivo del músculo. Valor normal: 0.8 a 1.4 mg/dL. Valor alto: puede indicar deshidratación, acromegalia (exceso de secreción de la glándula del crecimiento), eclampsia, distrofia muscular, etc. Valor bajo: puede indicar miastenia gravis.

Metodología

Material biológico

Suero o plasma heparinizado de un paciente con ayuno de ocho horas.

Material

- 1 Micropipeta de 1,000 μ L
- 1 Micropipeta de 200 μ L
- 1 Piseta con agua desionizada o destilada
- 2 Celdas de plástico de 3 mL
- 5 Tubos de vidrio de 13 x 100 mm
- Gradilla

Equipo

- Espectrofotómetro o fotómetro termostable a 37°C
- Centrífuga

Medidas de seguridad y salud ocupacional

Ver Anexo 1.

UNIDAD 5. APLICACIÓN DIAGNÓSTICA DE LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

PRÁCTICA 10 **PROTEÍNAS TOTALES. MÉTODO COLORIMÉTRICO** **BIURET**

DURACIÓN: 40 MINUTOS

Objetivos

- Conocer la metodología de Biuret para la determinación de proteínas totales para un procesamiento adecuado de una muestra biológica.
- Establecer los intervalos de referencia de proteínas y compararlos con el valor de nuestra muestra problema a analizar.

Generalidades

Las proteínas son los principales sólidos disueltos en el plasma sanguíneo. Para la síntesis de las proteínas séricas se requiere un hígado sano en plenas funciones, excepto en el caso de las gamma globulinas. El hígado tiene la capacidad de duplicar la producción y salida de proteínas durante las enfermedades asociadas con pérdida de proteínas. En consecuencia, no debe sorprender que las mediciones de proteínas totales no se alteren sino hasta que haya ocurrido una disminución extensiva de la función hepática. La proteína total del suero se compone de, por lo menos, varios cientos de proteínas individuales, algunas en cantidades muy pequeñas y otras,

como la albúmina y la inmunoglobulina G (IgG), en cantidades mayores. La concentración de proteína total es útil como un indicador aproximado de la nutrición, de la función gastrointestinal, como indicador de la viscosidad del plasma, y es la base para la cuantificación de las fracciones obtenidas por electroforesis. Una deficiencia de proteínas en la dieta, y ciertas condiciones patológicas que involucran a la absorción intestinal, dan como resultado una baja concentración de proteínas séricas, lo que se denomina hipoproteinemias. La hiperproteinemia se define en términos de proteínas séricas totales de más de 9.0 g/dL, y puede deberse casi exclusivamente a hipergammaglobulinemia. Las proteínas totales se dividen en albúminas y globulinas. Las globulinas son un grupo muy grande de proteínas que se sub clasifican en alfa, beta y gamma globulinas. Escriba a continuación una clasificación lo más completa posible de estas fracciones:

Alfa globulinas	Beta globulinas	Gamma globulinas

Cuando se les separa por electroforesis (**defina electroforesis**), se observan cinco fracciones: la más anódica es la prealbúmina y la albúmina, luego la alfa 1, alfa 2, beta y gamma, siendo estas últimas las más catódicas (**en la siguiente página dibuje el gráfico de una electroforesis de proteínas**).

Si además queremos separar inmunoglobulinas podemos hacer una inmunoelectroforesis (**defina inmunoelectroforesis**), teniendo como resultado la separación de las cinco fracciones de las gamma globulinas, que son la G, A, M, E y D (**en la siguiente página dibuje una inmunoelectroforesis de la fracción gamma de las proteínas séricas**).

Electroforesis: _____



Inmunoelectroforesis: _____



Además, si se requiere identificar a una globulina en particular, existen metodologías para realizarlo. Por ejemplo, se cuantifica la transferrina, todas las proteínas de la coagulación, las gamma globulinas, la transcobalamina, la hemo-pexina, haptoglobina, etcétera.

Existen varios métodos para la determinación de proteínas plasmáticas: a) técnicas densimétricas, basadas en la ley de Van Slyde, b) técnicas refractométricas, las cuales usan un refractómetro y se basan en el índice de refracción y c) técnicas colorimétricas, de las cuales la más utilizada es el método de Biuret.

Todos los métodos se basan en peso por volumen, por lo que deberán estar estandarizados con métodos gravimétricos. Las proteínas y los péptidos, al contrario que otros compuestos nitrogenados (urea, ácido úrico y creatinina) dan en solución alcalina con iones de cobre un complejo de color violeta. Esta reacción se llama Biuret. Sus resultados son reproducibles y coinciden con el estándar de oro: el método de Kjeldhal.

Materiales

Material biológico

Suero o plasma de un paciente con 8 horas de ayuno, o en fase postabsortiva (ayuno).

Conservación de la muestra

Si el suero se separa rápidamente y se conserva en congelación, se conserva bien siempre y cuando no se repita la operación varias veces porque pueden sufrir desnaturalizaciones. Si se conservan en refrigeración, los tubos deberán estar bien tapados para evitar la evaporación. Se puede emplear plasma usando heparina.

Material de laboratorio

- Tubos de ensaye de 13 x 100 mm
- 1 micropipeta de 1.0 mL
- 1 micropipeta de 10 mL

- Puntas para micropipeta
- Gradilla

Equipo

Espectrofotómetro o fotómetro termostable a 37°C con filtro de 540 nm.

Medidas de seguridad y salud ocupacional

Ver Anexo 1.

PRÁCTICA 11

DETERMINACIÓN DE ALBÚMINA MÉTODO VERDE DE BROMOCRESOL

DURACIÓN: 40 MINUTOS

Objetivos

- Conocer el método Verde de bromocresol para determinar la concentración de albúmina sérica.
- Establecer los intervalos de referencia de la albúmina y compararlos con el valor de nuestra muestra problema a analizar.

Generalidades

La albúmina es una proteína globular que se puede definir por cinco características:

1. Es soluble en sulfato de amonio 2.03 mol/L a 23°C y a pH superior a 6, cuando es dializada contra agua destilada.
2. La migración de la proteína en un campo electroforético es -6.0 unidades de movilidad de Tiselius, en buffer de barbital, en el cual una unidad de movilidad es 10-5 cm².V-1. seg-1.
3. El peso molecular es aproximadamente 66,000 daltons y sedimenta a una velocidad de 4.5 s.
4. No posee carbohidratos.
5. La albúmina es el componente principal del suero humano normal.

La albúmina humana ha sido aislada y purificada hasta el punto de determinar su secuencia. Está formada por 584 aminoácidos y el peso molecular calculado para esta secuencia es 66,248 daltons. La proteína tiene diversas funciones: desempeña un papel importante en el mantenimiento de la presión osmótica coloide de la san-

gre, en el transporte de varios iones, ácidos y hormonas y en la nutrición. Los valores bajos de albúmina pueden explicar la toxicidad de algunos fármacos, en los sueros hipoalbuminémicos, la forma libre (activa) de la droga puede ser mucho mayor que en los sueros con niveles normales de albúmina, debido a la gran diferencia en la capacidad de unión entre los dos tipos de sueros. La mayor cantidad de droga libre puede causar una respuesta tóxica. En la desnutrición, los niveles plasmáticos de albúmina disminuyen mucho más que los de la gammaglobulina. Otra de las funciones importantes de la albúmina es el mantenimiento de 75% de la presión osmótica coloide del plasma. Las alteraciones de los niveles séricos de albúmina pueden tener origen en un gran número de secuelas patológicas y, en consecuencia, no son específicas, aunque sí resultan útiles para evaluar el estado del paciente.

La hiperalbuminemia usualmente es atribuible a deshidratación o hemoconcentración. La hipoalbuminemia en general se debe a: 1) hemodilución, 2) síntesis inferior a la pérdida y 3) enfermedades que causan una gran pérdida de albúmina. La hemodilución puede ser causa del desequilibrio de electrolitos. La menor síntesis puede ser atribuida a la incapacidad para obtener nutrientes debido a una desnutrición, malabsorción o a una incapacidad del hígado para la síntesis de albúmina, ocasionada por enfermedades como hepatitis crónica o aguda. Con frecuencia, los niveles bajos de albúmina son debidos a grandes pérdidas, como en el caso de síndrome nefrótico, enteropatía con pérdida proteica o lesiones cutáneas exudativas. Si grandes áreas de la superficie cutánea están destruidas, se producen severas pérdidas por ellas. El esfuerzo físico, la hipertensión, la infección del tracto urinario y la enfermedad cardíaca congestiva pueden también aumentar la excreción urinaria de albúmina.

Los métodos de fijación de colorantes son los más usados para la determinación de albúmina sérica. La albúmina tiene la propiedad de fijarse a una amplia variedad de aniones orgánicos, incluyendo moléculas complejas de colorantes. Las técnicas de fijación de colorantes se basan en un desplazamiento del máximo de absorción del colorante cuando está unido a la albúmina. Este desplazamiento permite que el color resultante sea medido en presencia de un exceso de colorante, lo cual, junto con la alta afinidad de fijación con la albúmina, permite que todas las moléculas de esta proteína tomen parte de la reacción. Se ha empleado una gran

variedad de colorantes, incluyendo naranja de metilo, ácido 2-(4'-hidroxiazobenzeno) benzoico, verde de bromocresol y púrpura de bromocresol. La reacción con verde de bromocresol se lleva a cabo usualmente a pH 4.2-4.5 y se mide a 620-630 nm. La Asociación Americana de Química Clínica recomendó un método con verde de bromocresol. En este procedimiento, la absorbancia del verde de bromocresol unido a la albúmina se mide a 628 nm en un buffer de succinato. La púrpura de bromocresol reacciona con la albúmina a pH 5.2 y su desplazamiento de color se mide a 603 nm. El fundamento del método consiste en que el verde de bromocresol es un indicador de pH que cambia de amarillo a azul en un rango de pH de 3.8 a 5.4. A un pH de 4.0, la albúmina se une al colorante, produciendo un color que absorbe a 630 nm. El color es proporcional a la concentración de albúmina.

Materiales

Material biológico

Suero o plasma de un paciente con ayuno de ocho horas o en fase posabsortiva.

Material de laboratorio

- 5 tubos de ensaye de 13 x 100 mm
- 1 micropipeta de 1.0 mL
- 1 micropipeta de 10 mL
- Puntas para micropipeta
- Gradilla

Equipo

- Espectrofotómetro o fotómetro con filtro de lectura de 630 nm
- Centrifuga

Medidas de seguridad y salud ocupacional

Ver Anexo 1.

UNIDAD 6. ESTUDIO DE LOS LÍPIDOS Y DISLIPOPROTEINEMIAS COLESTEROL TOTAL, MÉTODO CHOD- PAP, COLESTEROL LDL Y HDL. TRIACILGLICÉRIDOS MÉTODO CINÉTICO

ESTUDIO DE LOS LÍPIDOS Y DISLIPOPROTEINEMIAS

Generalmente, se denominan trastornos lipídicos a cualquier alteración en los niveles normales de los lípidos en sangre. De forma mayoritaria nos vamos a referir al aumento de los niveles de colesterol (hipercolesterolemia) y de triglicéridos (hipertrigliceridemia), aunque hay otras alteraciones a tener en cuenta como es la disminución del colesterol HDL y el aumento del colesterol LDL. La búsqueda activa de pacientes con hiperlipemias está justificada por su gran importancia como factor de riesgo de enfermedad cardiovascular, ya que es, junto con la hipertensión y el tabaquismo, uno de los principales factores que predisponen a padecer una cardiopatía coronaria.

PRÁCTICA 12

COLESTEROL TOTAL MÉTODO ENZIMÁTICO (GOD-PAD)

DURACIÓN: 40 MINUTOS

Objetivo

- Conocer la fundamentación del método enzimático de punto final para determinar la concentración de colesterol total en una muestra biológica.

Generalidades

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

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

Debido a la atención que se ha dado a los alimentos libres de colesterol, es interesante observar que el organismo produce la mayor parte del colesterol en forma endógena. Las fuentes dietéticas aportan solo de 150 a 300 mg diarios, mientras que el hígado sintetiza 1.5 g al día. De hecho, el exceso de carbohidratos y proteínas de la dieta se utiliza para producir moléculas de acetato,

que posteriormente sirven para producir colesterol y ácidos grasos. Los lípidos endógenos que genera el hígado son transportados posteriormente en forma de lipoproteínas para su uso en todo el cuerpo. La circulación sistemática de colesterol es posible gracias a la formación de complejos solubles por unión a proteínas, las lipoproteínas séricas y entre ellas las de tipo b –low density lipoproteins (LDL)– son las que representan el mayor porcentaje, con aproximadamente 60% a 70% del total. El colesterol es un constituyente primario de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), pero puede encontrarse también en lipoproteínas de alta densidad (HDL) y en las de muy baja densidad (VLDL). Las diversas lipoproteínas y apoproteínas asociadas, cuando se analizan directa o indirectamente, producen datos diagnósticos útiles para el analista, ya que es posible determinar el riesgo de coronariopatía.

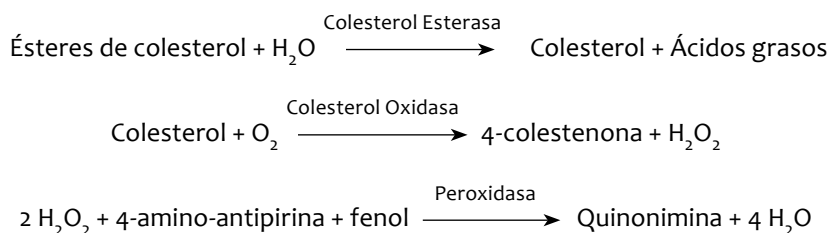
Clínicamente, es importante porque existe una relación entre la concentración del colesterol plasmático y la presencia de problemas cardíacos coronarios, hipertensión arterial, hipotiroidismo, diabetes mellitus, gota y aterosclerosis. En condiciones fisiológicas como el embarazo y la lactancia, puede encontrarse aumentado debido a dietas ricas en grasas de origen animal. También se eleva en la ictericia obstructiva, coleditiasis, mixedema, síndrome nefrótico, algunas xantomatosis. Niveles bajos se encuentran en desnutrición, insuficiencia hepática, hipertiroidismo, nefritis terminal, insuficiencia corticosuprarrenal (enfermedad de Addison) y tratamiento con insulina.

Los métodos químicos (como el de Liebermann 1885-Burchard 1890) han sido sustituidos por los métodos enzimáticos, los cuales resultan adecuados debido a su alta especificidad, exactitud y facilidad de realización. Básicamente, este tipo de métodos consta de tres etapas:

- Hidrólisis de los ésteres de colesterol, utilizando colesterol esterasa.
- Oxidación del colesterol catalizada por la colesterol oxidasa, reacción que produce delta-4-colestenona y peróxido de hidrógeno.
- Cuantificación de oxígeno consumido o el peróxido de hidrógeno formado.

Debe tenerse en cuenta que la enzima colesterol oxidasa no es específica para el colesterol, ya que se ha informado que el ácido ascórbico, la bilirrubina y la hemoglobina pueden interferir en grado variable. Sin embargo, estos métodos están sujetos a menos error que los químicos.

El colesterol y sus ésteres se liberan de las lipoproteínas por los detergentes. La enzima colesterol esterasa hidroliza los ésteres de colesterol presentes en la muestra, dando colesterol libre y ácidos grasos, en una posterior oxidación enzimática mediante la enzima colesterol oxidasa se forma H_2O_2 y colesteno-
nona. El H_2O_2 se valora por la reacción Trinder, mediante un cromógeno, fenol y 4-aminoantipirina, en presencia de peroxidasa, formando una quinonimina cuya coloración, encarnada, es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra.



Materiales

Muestra biológica

- El paciente debe encontrarse en un estado fisiológico regular (sin ejercicio vigoroso) y bajo su dieta ordinaria del día anterior a la prueba.
- La muestra debe recolectarse en ayuno total excepto agua, durante un lapso de 12 a 14 horas antes de la prueba.
- La muestra debe recolectarse en tubo recolector al vacío de tapón rojo el cual no contiene anticoagulante.
- La muestra debe centrifugarse a 3 500 rpm para separar el suero.
- La estabilidad de la muestra es de una semana guardada, tapada y a $2-8^\circ\text{C}$ o tres meses congelada a -20°C .

Reactivo 1

- Tampón pH 6.7 950 mmol/L
- Fenol 24 mmol/L
- Colato de Sodio 5 mmol/L
- Peroxidasa 1250 U/L
- Colesterol esterasa 200 U/L
- Colesterol oxidasa 300 U/L
- 4-aminoantipirina 0.5 mmol/L

Estándar

Solución colesterol 200 mg/dL, 2 g/L, 5,17 mmol/L

Material de laboratorio

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

Equipo

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 500-550 nm
- Centrífuga
- Baño seco o baño de agua a 37°C

Medidas de seguridad y salud ocupacional

Ver Anexo 1.

Intervalos de referencia

La American National Education Program ha establecido la siguiente clasificación de acuerdo con los niveles de colesterol total en suero y el riesgo de desarrollo de enfermedades coronarias cardíacas:

- **Normal**, menor a 200 mg/dL (5.17 mmol/L)
- **Límite alto**, 200 a 239 mg/dL (5.17 a 6.19 mmol/L)
- **Alto**, mayor a 240 mg/dL (6,20 mmol/L)

PRÁCTICA 13

COLESTEROL LDL Y HDL

DURACIÓN: 1 HORA

Objetivos

- Conocer la fundamentación de los métodos para determinar C-HDL y C-LDL para comprender el significado del riesgo aterosclerótico en los individuos.
- Establecer los intervalos de referencia ideales de las C-HDL y C-LDL para correlacionarlos con las enfermedades coronarias.

Generalidades

El contenido aproximado de colesterol con cada familia de lipoproteínas es variable (en porcentaje por unidad de peso). Dado que cada familia posee distinta actividad biológica, el significado clínico de un aumento de colesterol depende de la o las lipoproteínas que se encuentran en exceso. Por otra parte, los mecanismos reguladores de los niveles plasmáticos de lipoproteínas son muy complejos y pueden ser afectados por múltiples factores (genéticos, ambientales, fisiológicos o patológicos), siendo posible encontrar valores de colesterol total cercanos al rango normal, acompañados de alteraciones en las fracciones lipoproteicas.

Las HDL y las LDL han sido las más estudiadas por su importante actividad biológica:

- Las LDL, producto del metabolismo de las VLDL en plasma, son las encargadas del transporte del colesterol exógeno (y en mucho menos proporción, endógeno) hacia el interior de las células.
- Las HDL, sintetizadas en el hígado, remueven el colesterol no utilizado por las células (dentro de ciertos límites de concentración), transportándolo hacia el hígado para su degradación.

Diversos estudios epidemiológicos han confirmado que el exceso de colesterol de LDL con respecto a un valor crítico (1,9 g/l) debe ser considerado como factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad cardíaca coronaria, considerando que el efecto protector de las HDL solo parece tener relevancia dentro de cierto rango de concentraciones de colesterol circulante. Tales hallazgos permiten deducir que los valores aislados de colesterol de HDL (C-HDL) o de LDL (C-LDL) no pueden tomarse como índices predictivos de riesgo, sino que es necesario conformar un perfil lipídico con los valores de colesterol total, colesterol de HDL y colesterol de LDL.

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son partículas de origen no bien establecido, estrechamente relacionadas con el transporte reverso del colesterol y con una comprobada función antiaterogénica, que se debe solo en parte a este transporte reverso y a otras múltiples propiedades relacionadas con inflamación, función endotelial y mecanismos de aterotrombosis y fibrinólisis. Es sabido que tener colesterol HDL (C-HDL) bajo es un factor de riesgo independiente para enfermedad coronaria y eventos cardiocerebrovasculares y, por muchos años, se recomendó elevar el C-HDL por medios no farmacológicos, como dejar de fumar, perder el exceso de peso, combatir el sedentarismo y controlar la diabetes, en pacientes con LDL en valores normales.

Factores de riesgo de Enfermedad Cardiovascular

La aterosclerosis producida por el acúmulo de colesterol en las arterias es la causa subyacente a las enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares y vasculares periféricas. Por lo tanto, se considera que tener niveles altos de colesterol en sangre es un factor de riesgo que predispone a la enfermedad cardiovascular. Otros factores de riesgo que pueden aumentar las posibilidades de desarrollar esta enfermedad son los que aparecen a continuación:

Factores de riesgo que no se pueden modificar

- Edad: A partir de 45 años en el hombre y 55 en la mujer, el riesgo de sufrir un accidente cardiovascular aumenta.

- Historia familiar de enfermedad cardiovascular prematura.

Factores de riesgo que sí se pueden modificar

- Colesterol elevado
- Tabaquismo
- Tensión arterial elevada
- Diabetes mal controlada
- Triglicéridos elevados
- Obesidad o sobrepeso
- Estrés
- Inactividad física

Para realizar una valoración rápida y sencilla del riesgo de enfermedad cardiovascular al que está sometido un paciente en función de sus niveles de colesterol, se ha desarrollado el denominado Índice Aterogénico de Castelli. Se calcula dividiendo el valor de colesterol total entre el valor de colesterol HDL.

Índice Aterogénico = Colesterol Total / Colesterol HDL		
	Hombres	Mujeres
Riesgo bajo	Inferior a 5 %	Inferior a 4,5 %
Riesgo moderado	5-9 %	4,5-7%
Riesgo alto	Superior a 9%	Superior a 7%

En los últimos años, ha aparecido un nuevo trastorno denominado Síndrome Metabólico, que es una asociación de factores de riesgo para la enfermedad cardiovascular, como el trastorno lipídico, la diabetes y la hipertensión arterial.

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL o lipoproteínas) se separan del suero, precipitándolas selectivamente mediante el agregado de polímeros de alto peso molecular. Luego de centrifugar, en el sobrenadante quedan las demás lipo-

proteínas (HDL y VLDL); el colesterol ligado a las mismas se determina empleando el sistema enzimático Colesterol Oxidasa/Peroxidasa con colorimetría según Trinder. Por diferencia entre el colesterol total y el determinado en el sobrenadante, se obtiene el colesterol unido a las LDL.

Materiales

Material biológico

Muestra de suero de un paciente al que se le hará la determinación.

Material de laboratorio

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

Equipo

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas
- Centrífuga.
- Baño seco o baño de agua a 37°C

Intervalos de referencia

Colesterol LDL

- Límite superior deseable por debajo de 130 mg/dL.
- Límite alto: 130-150 mg/dL.
- Por encima de 150 mg/dL se consideran resultados patológicos. Colesterol HDL.
- El intervalo de normalidad: 40-60 mg/dL.

- Valores inferiores a 40 mg/dL indican un mayor riesgo de sufrir enfermedad cardiovascular.

Medidas de seguridad y salud ocupacional

Ver Anexo 1.

PRÁCTICA 14

TRIACILGLICÉRIDOS MÉTODO ENZIMÁTICO (GOD-PAD)

DURACIÓN: 40 MINUTOS

OBJETIVOS

- Conocer la fundamentación por el método enzimático para la determinación de triacilglicéridos plasmáticos.
- Destacar la importancia de los triacilglicéridos en el metabolismo humano para relacionarlo con diversas patologías coronarias.

Generalidades

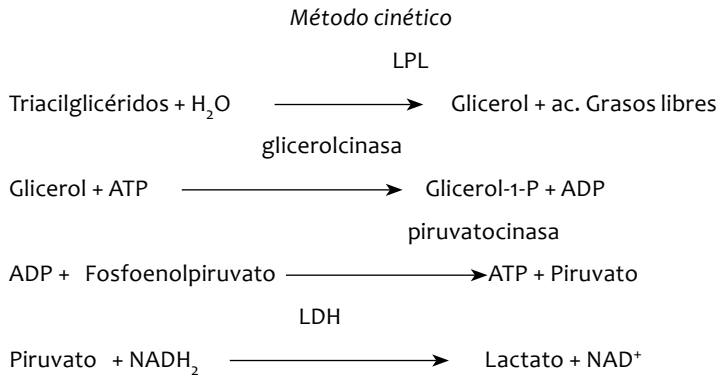
Las fuentes de lípidos pueden ser exógenas o endógenas; sus vías metabólicas hacia todas las áreas del organismo y procedentes de ellas constituyen una red compleja de reacciones químicas en las que participan moléculas individuales y lipoproteínas de gran tamaño. Los triacilglicéridos están constituidos por glicerol y ácidos grasos. Estos forman parte de las cinco clases de lipoproteínas que transportan a los lípidos en el plasma:

- Quilomicrones, constituidos casi totalmente por triglicéridos dietéticos.
- Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL).
- Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL).
- Lipoproteínas de baja densidad (LDL), conocidas también como lipoproteínas beta.
- Lipoproteínas de alta densidad (HDL), también conocidas como lipoproteínas alfa.

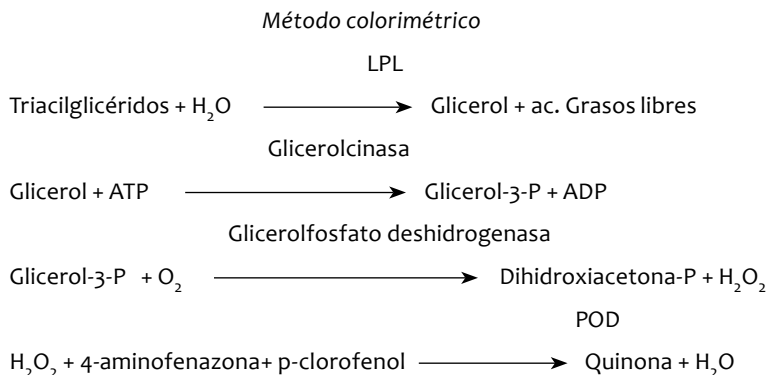
Aproximadamente, 40% del consumo de calorías en la dieta consta de lípidos y alrededor del 35% provienen de lípidos animales y 5% de lípidos vegetales

poliinsaturados. Los triacilglicéridos constituyen una porción importante (98 a 99%) de los lípidos animales y el resto son colesterol y otros lípidos. Los padecimientos en los cuales predominan los triacilglicéridos son xantoma eruptivo, lipemia retiniana, organomegalia, pancreatitis, intolerancia a la glucosa, hiperuricemia, aterosclerosis prematura, diabetes mellitus insulino-pénica, disglobulinemia, lupus eritematoso, embarazo, uso de hormonas, enfermedad por almacenamiento de glucógeno, alcoholismo, enfermedad de Gaucher, mieloma. Los incrementos en los valores de triacilglicéridos en el infarto miocárdico pueden durar un periodo tan prolongado como de un año. Las concentraciones de triacilglicéridos en sí tienen poco valor de predicción y aumentan después de la ingestión de grasa.

La mayoría de los métodos actuales para determinar triacilglicéridos están basados en el glicerol. El glicerol puede ser liberado por hidrólisis química mediante saponificación alcalina o con la enzima lipoproteinlipasa (LPL). Una vez liberado el glicerol de los triacilglicéridos, se puede cuantificar por métodos químicos o enzimáticos. Los métodos enzimáticos pueden ser colorimétricos o cinéticos.



El consumo de NADH_2 (disminución de la absorbancia) es proporcional a la concentración de glicerol proveniente de los triacilglicéridos séricos.



Por medio de este método, el glicerol es fosforilado por la glicerolfosfato deshidrogenasa (GPO) y ATP en presencia de glicerol quinasa (GK) para producir glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosina-5-difosfato (ADP): El G3P es entonces convertido a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrógeno por GPO. Al final del peróxido de hidrógeno reacciona con 4-aminofenazona (4-AF) y p-clorofenol, reacción catalizada por la peroxidasa (POD) dando una coloración roja. La intensidad del color es proporcional a la concentración de triacilglicéridos presentes.

Materiales

Muestra biológica

Suero: el paciente deberá encontrarse en un estado fisiológico regular (sin ejercicio vigoroso) y bajo su dieta ordinaria del día anterior a la prueba. La muestra debe recolectarse en ayuno total de 12 a 14 horas antes de la prueba, excepto agua. La muestra debe recolectarse en un tubo recolector al vacío de tapón rojo, el cual no contiene anticoagulante. Para separar el suero, la muestra debe centrifugarse durante 10 minutos a 3 500 rpm.

NOTA: Los triacilglicéridos son estables en suero tres días a 2-8°C o una semana a 15-25°C.

Reactivo R:

- GOOD pH 6.3 50 mmol/L
- P-clorofenol 2 mmol/L
- LPL 150 000 U/L
- GK 500 U/L
- GPO 3 500 U/L
- 4-AF 0.1 mmol/L
- ATP 0.1 mmol/L Calibrador de triglicéridos

El reactivo R y el calibrador están listos para su uso.

Material de laboratorio

- Tubos de ensayo de 13 x 100 mm
- 1 micropipeta de 1 mL
- 1 micropipeta de 10 mL
- Puntas para micropipeta
- Gradilla

Equipo

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 505 nm
- Centrífuga
- Baño seco o baño de agua a 37°C

Intervalos de referencia

- Hombres 40-160 mg/dL
- Mujeres 35-135 mg/dL

Medidas de seguridad y salud ocupacional

Ver Anexo 1

ANÁLISIS DE ELECTROLITOS SÉRICOS

Los electrolitos son sustancias que en solución acuosa se dividen en sus átomos o radicales constitutivos; estos reciben el nombre de iones y poseen cargas eléctricas de igual valor y signos opuestos. En el organismo, los electrolitos pueden ser intracelulares: iones potasio, magnesio, calcio, sulfatos y fosfatos; o extracelulares: sodio, cloruro y bicarbonato (tabla 1).

Tabla 1. Composición electrolítica de los fluidos

Electrolitos	Fluido intercelular	Fluidos extracelular
CATIONES		
Sodio (Na^+)	15 mEq/L	140 mEq/L
Potasio (K^+)	155 mEq/L	5 mEq/L
Calcio (Ca^{++})	5 mEq/L	5 mEq/L
Magnesio (Mg^{++})	30 mEq/L	2 mEq/L
ANIONES		
Cloro (Cl^-)	2 mEq/L	102 mEq/L
Bicarbonato (HCO_3^-)	8 mEq/L	24 mEq/L
Proteínas	55 mEq/L	16 mEq/L
Fosfatos (HPO_4^-)	95 mEq/L	2 mEq/L
Sulfatos (SO_4^-)	20 mEq/L	1 mEq/L
Aniones orgánicos		6 mEq/L

En el organismo los electrolitos desempeñan muchas funciones importantes, entre ellas destacan los iones sodio y potasio y los aniones cloro y bicarbonato, ya que son los que principalmente mantienen la presión osmótica extra e intracelular y la electro-neutralidad del plasma; además, contribuyen a regular el pH sanguíneo.

UNIDAD 7. ANÁLISIS DE ELECTROLITOS SÉRICOS

PRÁCTICA 15 DETERMINACIÓN DE CLORUROS MÉTODO DE SCHALES Y SCHALES

DURACIÓN: 40 MINUTOS

Objetivos

- Conocer el método colorimétrico de Schales y Schales para determinar la concentración en una muestra biológica de cloro.
- Destacar la importancia del ion cloro en el metabolismo humano para relacionarlo con diversas patologías.

Generalidades

El cloro, el principal anión extracelular, ejerce un efecto directo sobre la presión osmótica, la distribución del agua y el equilibrio entre aniones y cationes. Se encuentra hipercloremia en la acidosis e hipocloremia en la alcalosis.

1. **Hipercloremia:** existe en la acidosis que se presenta en los cardíacos, tratados con cloruro de amonio, en el suministro excesivo de solución salina, con la deshidratación y la hipertensión. La hipercloremia es grave cuando se sobrepasa los 125 mEq/L.

2. **Hipocloremia:** existe en las fases avanzadas de insuficiencia renal por nefritis, como consecuencia de vómitos abundantes y repetidos, cuando se hacen lavados gástricos o se aplica permanentemente una sonda gástrica, en diarreas y sudoración abundante y cuando falta sodio, pudiendo en este último caso conducir a la deshidratación y uremia. La hipocloremia es grave si los valores son inferiores a 80.

En presencia de nitrato férrico y tiocianato de mercurio, los iones cloruro provocan la formación de tiocianato férrico. La intensidad del tono marrón de este complejo es proporcional a la concentración de cloruros.

Materiales

Muestra biológica

Suero, plasma heparinizado u orina de 24 horas.

Reactivos

- Reactivo 1
- Tiocianato de mercurio (II)
- Nitrato de hierro (III)
- Ácido nítrico
- Estándar: Cloruro 100 mEq/L; 100 mmol/L

Material de laboratorio

- Tubos de ensayo de plástico de 13 x 100 mm
- Micropipetas de diversas capacidades
- Puntas para micropipeta
- Pipetas graduadas de 1, 2 y 5 mL
- Gradilla

Equipo

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 500-550 nm
- Centrífuga
- Baño seco o baño de agua a 37°C

Interferencias

Pueden interferir triglicéridos (desde 180 mg/dL), glucosa (500 mg/dL), ácido ascórbico (desde 8 mg/dL) y hemoglobina (300 mg/dL).

Medidas de seguridad y salud ocupacional

Ver Anexo 1.

PRÁCTICA 16

DETERMINACIÓN DE FOSFATO

MÉTODO DE FISKE-SUBBAROW

DURACIÓN: 40 MINUTOS

Objetivos

- Aplicar el método de colorimétrico de Fiske-Subbarow para determinar la concentración de fosfato en una muestra biológica.
- Destacar la importancia del ion fosfato en el metabolismo humano para relacionarlo con diversas patologías.

Generalidades

La determinación de fosfato tiene diversas funciones importantes. El fosfato interviene en el metabolismo de los carbohidratos, como intermediarios fundamentales y como donantes de fosfatos de alta energía (ATP). Además, es constituyente de ácidos nucleicos, fosfolípidos, nucleótidos y otras moléculas. El fósforo se excreta en las heces y en la orina, principalmente en forma de fosfato. Hay hiperfosfatemia en la insuficiencia renal crónica, hipoparatiroidismo y leucemia. Hay hipofosfatemia en el raquitismo, el hiperparatiroidismo y en la esteatorrea.

El fósforo inorgánico, presente en el suero y otros líquidos corporales, forma fosfomolibdato con molibdato de sodio. Por reducción con sulfato de p-metilaminofenol se transforma en fosfomolibdato en azul de molibdeno coloidal, que puede determinarse fotométricamente. La cantidad de azul de molibdeno formado es proporcional a la cantidad de fosfato inorgánico existente.

Muestra biológica

Suero, plasma heparinizado libre de hemólisis. El suero o plasma deben separarse cuanto antes de los eritrocitos con el fin de evitar el incremento en la cantidad de fosfato proveniente de los eritrocitos.

Orina de 24 horas. Recoger la orina en recipientes conteniendo 10 ml de ácido clorhídrico al 10%, para evitar la precipitación de fosfatos. Ajustar el pH a 2.0. Diluir la muestra con agua destilada. Mezclar y multiplicar el resultado por 10.

Reactivos

- Reactivo 1
- Molibdato amónico
- Ácido sulfúrico
- Detergente

Precauciones: el material es corrosivo y provoca quemaduras graves. En caso de accidente consultar el inserto de acuerdo al número de código en el kit de fosfato. Estándar: fósforo acuoso 5 mg/dL. Debido a la naturaleza del producto es aconsejable tratarlo con sumo cuidado ya que puede contaminarse con facilidad.

Equipo

- Espectrofotómetro
- Centrifuga
- Baño seco o baño de agua a 37°C, 30°C o 25°C

Material de laboratorio

- Tubos de ensayo de plástico de 13 x 100 mm
- Micropipetas de diversas capacidades

- Puntas para micropipeta
- Pipetas graduadas de 1, 2 y 5 mL
- Gradilla

Interferencias

No realizar la prueba con muestras hemolizadas ya que los hematíes contienen una alta concentración de ésteres de fósforo orgánico, que es hidrolizado a fósforo inorgánico durante su conservación, el incremento es de 4-5 mg/dL por día. Se han descrito drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación del fósforo. La mayoría de los detergentes utilizados para el lavado del material contienen quelantes y fosfatos que interfieren en el ensayo. Se recomienda limpiar el material con ácido nítrico diluido y enjuagar con abundante agua desionizada.

Medidas de seguridad y salud ocupacional

Ver Anexo 1.

PRÁCTICA 17

DETERMINACIÓN DE CALCIO

MÉTODO DE ARSENAZO

DURACIÓN: 40 MINUTOS

Objetivos

- Aplicar el método colorimétrico de arsenazo para determinar la concentración de calcio en una muestra biológica.
- Destacar la importancia del ion calcio en el metabolismo humano para relacionarlo con diversas patologías.

Generalidades

El calcio es el catión más abundante en el organismo humano, solo 1% se encuentra en los líquidos extracelulares, el resto se localiza en los huesos en la forma cristalina de fosfato e hidróxido de calcio que en conjunto constituyen la hidroxapatita. Existe una estrecha relación entre el metabolismo del calcio y del fósforo por lo que se requiere de una regulación precisa en la concentración de ambos elementos en el líquido extracelular. En el plasma aproximadamente la mitad del calcio está en forma ionizada libre (50%) y la otra mitad unida a proteínas predominantemente (40-45%) y a ácidos orgánicos (5 a 10%). La forma libre es fisiológicamente importante, pero en los laboratorios se cuantifica el calcio plasmático total. En la acidosis el calcio libre se eleva y la del unido disminuye, en la alcalosis sucede lo contrario. Los niveles de proteínas en suero deben ser considerados para una adecuada interpretación de la concentración total de calcio en suero.

Hipercalcemia: se presenta en hiperparatiroidismo, tumores y metástasis en hueso, hipertiroidismo o sobredosis de vitamina D. Hay hipocalcemia: fallo renal crónico con hipercreatinemia e hiperfosfatemia, hipoparatiroidismo y deficiencia de vitamina D.

Calciuria: se presentan en litiasis y tubulopatías renales.

El arsenazo III (ácido 2,7-(bis (2-arsonofenilazo))-1,8-dihidroxi-naftaleno- 3,6 disulfónico) se forma en un medio neutro un complejo azul con el calcio. La intensidad del color azul es directamente proporcional a la concentración de calcio total.

Materiales

Muestra biológica

- Suero
- Orina de 24 horas sin preservativos

Material de laboratorio

- Tubos de ensayo de plástico de 13 x 100 mm
- Micropipetas de diversas capacidades
- Puntas para micropipeta
- Pipetas graduadas de 1, 2 y 5 mL
- Gradilla

Equipo

- Espectrofotómetro
- Centrifuga
- Baño seco o baño de agua a 37°C, 30°C o 25°C

Medidas de seguridad y salud ocupacional

Ver Anexo 1.

PRÁCTICA 18

DETERMINACIÓN DE MAGNESIO

MÉTODO COLORIMÉTRICO

DURACIÓN: 40 MINUTOS

Objetivo

Determinar la concentración de magnesio en una muestra biológica utilizando el método colorimétrico para posteriormente relacionarlo con diversas patologías.

Generalidades

El magnesio es el segundo catión más abundante intracelularmente; aproximadamente una mitad se localiza en los huesos y la otra en tejidos suaves y eritrocitos. Hay una pequeña fracción de magnesio circulante, pero se transporta de los sitios de reserva (huesos) a los tejidos a través del plasma, en caso necesario. Actúa como activador de enzimas, enlace entre ellas y como sustrato; participa también en la fosforilación oxidativa de la mitocondria.

Hipomagnesemia: se presenta en diabetes, alcoholismo, embarazo, ingesta de anticonceptivos, algunos diuréticos, hipertiroidismo, síndrome de mala absorción, hiperalimentación, infarto al miocardio, insuficiencia cardíaca y cirrosis hepática.

Hipermagnesemia: presente en insuficiencia renal, ingesta exagerada de antiácidos que contienen magnesio y en el abuso de magnesio.

El magnesio en soluciones alcalinas forma complejos de color rojo con la calgami, un indicador metalocrómico. El ácido etilenglicoltretacético (EGTA) elimina la interferencia del calcio.

Materiales

Muestra biológica

- Suero libre de hemólisis o plasma con heparina, no utilice EDTA, o agentes quelantes, oxalato o citrato.
- Orina de 24 horas diluida 1/5 con agua destilada y acidificada con HCl para alcanzar un pH alrededor de 1.0.

Reactivos

- Reactivo 1
- 2-metil-2-amino-1-propanol EGTA
- Reactivo 2, calmagita
- Estándar: magnesio 2 mg/dl, 20 mg/L, 824 $\mu\text{mol/L}$

Material de laboratorio

- Tubos de ensayo de 13 x 100 mm
- Micropipetas de diversas capacidades
- Puntas para micropipeta
- Pipetas graduadas de 1, 2 y 5 mL
- Gradilla

Equipo

- Espectrofotómetro o fotocolorímetro
- Centrífuga
- Baño seco o baño de agua a 37°C

Medidas de seguridad y salud ocupacional

Ver Anexo 1.

PRÁCTICA 19

DETERMINACIÓN DE SODIO

MÉTODO COLORIMÉTRICO

DURACIÓN: 40 MINUTOS

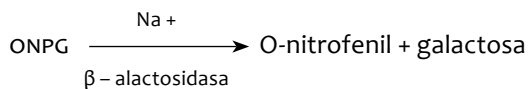
Objetivo

- Utilizar el método colorimétrico para la determinación de la concentración de sodio en una muestra biológica.

Generalidades

La prueba del sodio sérico es una medida del catión principal (electrolítico, carga positiva) en el espacio vascular, componente del líquido extracelular. Deberá considerarse una medida proporcional, la proporción entre sodio y agua, más que una medición directa del sodio corporal total. El sistema amortiguador del bicarbonato de sodio es uno de los principales controles reales de las concentraciones de iones hidrógeno, que convierten al sodio en un catión importante para la conservación del equilibrio ácido-básico corporal y también para la distribución del agua corporal. La hipernatremia significa un exceso de sodio en la sangre; esto se advierte cuando hay vómito profuso, succión nasogástrica, enfermedades infecciosas como traqueobronquitis, diarrea acuosa profusa, diabetes insípida, aldosteronismo primario, ingestión inadecuada de agua libre, alimentos con alto contenido de solutos. La hiponatremia es una deficiencia sanguínea de sodio o una depleción de sal que, por lo general, indica un aumento excesivo de agua respecto a la elevación del sodio. Esto sucede en diarrea o vómito, donde se pierde más sodio que agua, drenado de fístulas intestinales, uso prolongado de diuréticos, enfermedad de Addison, insuficiencia renal crónica con acidosis, retención anormal de agua, ingestión excesiva de agua y restitución inadecuada de sal.

El sodio se determina enzimáticamente a través de la actividad de la β -galactosidasa dependiente de sodio con el ONPG como sustrato. La absorbancia a 405 nm del producto O-nitrofenil es proporcional a la concentración de sodio.



ONPG = o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido

Materiales

Muestra biológica

- Suero, plasma heparinizado libre de hemólisis

Material de laboratorio

- Tubos de ensayo de 13 x 100 mm
- Micropipetas de diversas capacidades
- Puntas para micropipeta
- Pipetas graduadas de 1, 2 y 5 mL
- Gradilla

Equipo

- Espectrofotómetro o fotocolorímetro
- Centrífuga
- Baño seco o baño de agua a 37°C

Medidas de seguridad y salud ocupacional

Ver Anexo 1.

PRÁCTICA 20

DETERMINACIÓN DE POTASIO

MÉTODO COLORIMÉTRICO

DURACIÓN: 40 MINUTOS

Objetivo

- Determinar la concentración de potasio en una muestra biológica utilizando el método colorimétrico para relacionarlo, en caso de que sus valores estén elevados, con alguna patología.

Generalidades

El potasio es el catión principal del líquido intracelular. Un desequilibrio en el nivel de potasio tiene un efecto directo sobre la irritabilidad muscular, la función miocárdica y la respiración. La hiperpotasemia se define como una concentración plasmática mayor de 5.5 mEq/L. Con una función renal adecuada es virtualmente imposible permanecer en un estado de hiperpotasemia, pues el potasio es excretado con suma facilidad por el riñón. Por tanto, un incremento significativo de potasio se encuentra principalmente en casos de insuficiencia renal grave con azoemia. También podría haber aumento con una administración desmedida de potasio, si hay excreción urinaria inadecuada, con el uso excesivo de diuréticos antagonistas de la aldosterona.

La hipopotasemia se define como una concentración sérica menor de 3.5 mEq/L. Los síndromes de deficiencia de potasio son bastante comunes. Si esta deficiencia es grave, se producen cambios funcionales y estructurales en el riñón, los cuales perpetúan el desequilibrio hidroelectrolítico y ácido básico. Se tiene disminución de potasio en estados diarreicos, pérdidas abundantes de líquidos gastrointestinales, diuresis masiva, pacientes posoperatorios con pérdidas múltiples de potasio, pacientes después de tratamiento de cetoacidosis diabética, res-

puesta a la tensión, falta de ingestión adecuada de potasio, síndrome de malabsorción, donde el intestino no es capaz de absorber nutrientes.

La determinación de potasio se lleva a cabo espectrofotométricamente con un sistema de ensayo cinético acoplado, basado en una piruvato quinasa dependiente de potasio. El piruvato generado se convierte en lactato que convierte NADH análogo en NAD análogo. La correspondiente disminución de la densidad óptica a 380 nm es proporcional a la concentración de potasio en suero.

Materiales

Muestra biológica

Suero, plasma heparinizado libre de hemólisis

Material de laboratorio

- Tubos de ensayo de 13 x 100 mm
- Micropipetas de diversas capacidades
- Puntas para micropipeta
- Pipetas graduadas de 1, 2 y 5 mL
- Gradilla

Equipo

- Espectrofotómetro o fotolorímetro
- Centrífuga
- Baño seco o baño de agua a 37°C

Medidas de seguridad y salud ocupacional

Ver Anexo 1.

UNIDAD 8. VALORACIÓN DE FUNCIÓN RENAL Y VÍAS URINARIAS

PRÁCTICA 21 EXAMEN GENERAL DE ORINA (EGO)

DURACIÓN: 90 MINUTOS

Objetivos

- Establecer el método adecuado para la recolección de especímenes de orina.
- Conocer las propiedades físicas más importantes de la orina para relacionarlas con la enfermedad.
- Identificar los constituyentes químicos más importantes de la orina para cuantificarlos.
- Describir los hallazgos microscópicos más comunes en la orina para relacionarlos con la enfermedad.

Generalidades

Los análisis de orina realizados en el laboratorio clínico pueden proporcionar una información amplia, variada y útil del riñón de un individuo y de las enfermedades sistémicas que pueden afectar este órgano excretor. Por medio de este análisis, es posible elucidar tanto desórdenes estructurales (anatómicos) como desórdenes funcionales (fisiológicos) del riñón y del tracto urinario inferior, así como sus causas y su pronóstico. La realización cuidadosa del examen de orina, por parte del laboratorio, ayuda al diagnóstico diferencial de numerosas enfermedades del

sistema urinario. Usualmente, los datos de laboratorio obtenidos por medio de este análisis se logran sin dolor, daño o tensión para el paciente. Esta es la razón por la cual la realización e interpretación correcta del análisis de orina es una herramienta esencial de la práctica clínica.

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

El análisis general de orina se basa en un procedimiento que se compone de dos partes: 1) un análisis macroscópico, en el cual se determinan las características físicas y químicas de los constituyentes químicos por medio de la tira reactiva y 2) un examen microscópico del sedimento urinario.

Materiales

Muestra biológica

El cuidado en la recolección de la orina y su entrega rápida en el laboratorio son cruciales para obtener una información óptima:

- La orina debe ser colectada en un recipiente limpio, estéril, que tenga un cierre seguro para prevenir posibles derramamientos, evaporación o contaminación.
- Estos recipientes deben rotularse con el nombre del paciente, la fecha y la hora de recolección.

- Es esencial que la orina sea examinada dentro de las 2 horas siguientes a su recolección o preservada de alguna manera, usualmente por refrigeración (2° a 8° C), para que los datos del uroanálisis sean precisos.

Pueden usarse fijadores o preservativos adecuados, siempre y cuando se entiendan claramente sus efectos sobre la orina y sobre los ensayos realizados en ella. Si la orina es recolectada sin preservativos y permanece a temperatura ambiente empezará a descomponerse. Los preservativos actúan impidiendo los cambios químicos asociados a la descomposición y previniendo el crecimiento y metabolismo de los microorganismos. El tolueno, el fenol, el timol y los preservativos ácidos se usan frecuentemente para los análisis químicos de la orina. Otras formas de preservación incluyen el ajuste del pH y la protección de la luz. Para preservar las estructuras celulares puede emplearse etanol (95%); también hay disponibles fijadores comerciales como Mucolox. Las muestras deben estar libres de secreciones vaginales u otra clase de partículas extrañas. La recolección del chorro medio sin el lavado previo y sin usar un envase estéril, proporciona una muestra satisfactoria para el examen de rutina; sin embargo, lo más conveniente es tomar la muestra de forma correcta.

Reactivos

- Tiras reactivas para orina
- Ácido nítrico concentrado

Material de laboratorio

- Envases desechables para orina
- Tubos de ensayo de 13 x 100 mm
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Pipetas serológicas graduadas de 10 mL
- Pipetas Pasteur
- Bulbos de goma

Equipo

- Microscopio óptico
- Centrifuga clínica

Métodos

Examen físico de la orina

1. Volumen

El volumen urinario está influenciado por la ingesta de líquidos; por los solutos excretados, principalmente, sodio y urea; por la pérdida de fluidos en la transpiración y la respiración; y por el estado de los sistemas cardiovascular y renal. Normalmente un adulto excreta de 750 a 2000 mL en 24 horas. El volumen de orina de un espécimen recolectado al azar no tiene importancia clínica.

2. Olor

Una orina normal fresca no tiene mal olor. Un olor desagradable puede indicar que el espécimen es demasiado viejo para obtener un análisis preciso. Un olor fétido en un espécimen recolectado, desde hace más de 2 horas (y no preservado o refrigerado), indica que el espécimen es inadecuado. El olor puede también dar señales de ciertas anormalidades de la orina. Un olor parecido al amoníaco es sugestivo de presencia de bacterias degradadoras de la urea, un olor a frutas indica la presencia de acetona (cetonas), un olor dulce es sugestivo de la presencia de glucosa u otros azúcares, un olor fétido es sugestivo de pus o inflamación.

3. Color

El color de la orina está determinado, en gran medida, por su grado de concentración. Las orinas normales varían ampliamente de colores, desde incoloras hasta amarillo oscuro. La interpretación del color es subjetiva y varía según el laboratorio que examine la muestra. Para describir adecuadamente el color de la orina,

el analista puede emplear como puntos de referencia una escala estandarizada de colores, evitando el uso de términos ambiguos como pajizo o sangriento. La orina roja es, tal vez, la coloración de mayor importancia clínica. Este color puede producirse por hemoglobina urinaria o mioglobina, eritrocitos intactos, eritrocitos hemolisados o hemoglobina libre (hemólisis). En la glomerulonefritis aguda el color característico de la orina es pardo rojizo. Normalmente una orina fresca es clara.

4. Aspecto

La orina recién emitida es clara o transparente, conforme la orina se deja reposar, se precipitan cristales amorfos, generalmente uratos, produciendo turbidez. La turbidez de la orina debe ser registrada y explicada mediante la evaluación microscópica como límpida o clara, turbia o muy turbia.

5. Gravedad específica

La gravedad específica de la orina es una medida parcial de la capacidad del riñón para concentrar orina. Su rango normal es de 1.003 a 1.035 g/mL. Los valores iguales o superiores a 1.020 indican una buena función renal y la excreción de una cantidad aumentada de solutos disueltos excretados por los riñones. Valores de densidad específica iguales o superiores a 1.035 indican la presencia de solutos extraños, lo cual debe investigarse. Una disminución de la gravedad específica se observa en pacientes que usan diuréticos. Cuando se presentan niveles elevados de glucosa o proteínas, es necesario aplicar factores de corrección para ajustar la gravedad específica a un valor más representativo; se debe restar 0.004 por cada 10 g/l de glucosa y 0.003 por cada 10 g/l de proteína. Valores de 1.040 o superiores están asociados con la presencia de medios de contraste radiográficos o preservativos.

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

reactivas disponen de un método colorimétrico indirecto para medir la gravedad específica. En este método se usa una tira que contiene un electrolito pretratado que muestra un cambio de pH de acuerdo con la concentración iónica de la orina. Este ensayo es rápido, sencillo y no requiere de equipos adicionales.

Examen químico de la orina

1. Análisis por tira reactiva

Los análisis por tira reactiva han permitido a los laboratorios producir resultados químicos semicuantitativos de forma rápida, exacta y eficiente. En general, los análisis de orina adecuadamente realizados por medio de tiras reactivas son sensibles, específicos y económicos. Los análisis realizados por medio de tiras reactivas deben efectuarse en orinas bien mezcladas y equilibradas a la temperatura ambiente. Cada parámetro químico debe ser evaluado en un intervalo específico, de acuerdo con lo indicado en las instrucciones del fabricante. Debe tomarse del envase, solamente el número de tiras requerido para los análisis inmediatos y tapar nuevamente el envase, asegurando que la tapa quede bien ajustada. Las tiras reactivas deben almacenarse en un lugar fresco (no refrigeradas). El medio ambiente debe estar libre de humedad. Nunca se deben usar tiras para orina caducadas o expuestas al aire.

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

2. pH urinario

Aunque el método estándar para la medición del pH emplea electrodos de vidrio, el pH urinario, usualmente, es medido con indicador de papel, debido al hecho de que

pequeños cambios en el pH son de poca importancia clínica. La mayoría de los laboratorios de uroanálisis emplean tiras reactivas multitest con dos indicadores, rojo de metilo y azul de bromotimol. Estos indicadores proporcionan un rango de pH de 5.0 a 9.0, el cual se manifiesta por un cambio de color de naranja (ácido) a verde y azul (alcalino). El rango de pH urinario es 4.7 a 7.8. Las muestras de orina extremadamente ácidas o alcalinas, usualmente indican especímenes mal recolectados. El pH es importante para el manejo clínico de las piedras o cristales. Un pH alcalino refleja una alimentación rica en vegetales y un pH ácido una alimentación rica en carnes.

3. Proteínas

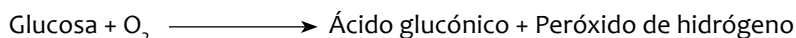
Las personas sanas pueden tener una excreción diaria de proteínas de 100 mg/día, una fracción muy pequeña del contenido de proteínas plasmáticas. La mayoría de la proteína en la orina es albúmina que pasa la membrana glomerular, pero también pueden estar presentes proteínas de peso molecular pequeño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

Las tiras reactivas son un procedimiento de tamizaje para la proteinuria. Como la especificidad de las tiras reactivas está limitada a la detección de albúmina, es altamente recomendable que el laboratorio procese simultáneamente una prueba por tira reactiva y una prueba de precipitación por ácido para la detección de todos los tipos de proteínas. Las tiras reactivas son sensibles al pH y dependen de la presencia de proteínas para la generación de color. La presencia de la proteína en la tira cambia el pH del medio de contraste impregnado en la zona reactiva, proteína pH 3: azul de tetrabromofenol. Resultados negativos (amarillo) sin proteína. Un resultado positivo o débilmente positivo debe ser confirmado por otros métodos más específicos como el ácido tricloroacético, el ácido sulfosalicílico o el ácido nítrico. Un resultado débilmente positivo y uno fuertemente positivo puede indicar la presencia de fármacos o proteínas de Bence Jones.

Glucosa

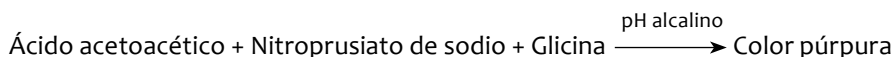
1. Ensayos enzimáticos

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



2. Cetonas

El término cuerpos cetónicos incluye tres componentes químicos diferentes pero muy relacionados: ácido acetoacético, ácido beta hidroxibutírico y acetona. Los ensayos realizados por medio de tiras reactivas emplean la reacción de nitroprusiato de sodio que detecta acetona y ácido acetoacético pero no beta hidroxibutírico. Es importante saber que el reactivo de nitroprusiato de sodio reacciona principalmente con el ácido acetoacético; la acetona tiene solo 20% de reactividad comparada con el ácido acetoacético:

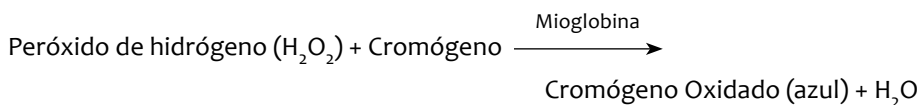


La determinación de cetonas es importante en el monitoreo de la diabetes y de la cetoacidosis y debe realizarse siempre que se determinen azúcares.

3. Sangre y mioglobina

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

minar hemoglobina o mioglobina se fundamenta en una actividad semejante a la de las peroxidasas:



Un ensayo positivo indica la presencia de hematuria, hemoglobinuria o mioglobinuria, siendo necesario un análisis microscópico para confirmar la presencia de eritrocitos. La presencia en la orina de agentes oxidantes, como los yoduros y bromuros, puede causar resultados falsos positivos; grandes cantidades de ácido ascórbico (usado en algunos antibióticos) pueden producir resultados falsos positivos en algunas tiras reactivas. La mioglobina es una porfirina ferrosa similar a la hemoglobina; comúnmente se encuentra en la orina en pacientes con traumas severos que involucran destrucción muscular. Cuando la mioglobina es liberada a la circulación es rápidamente excretada por el riñón. Como en el caso de la hemoglobina, su presencia producirá orinas de apariencia rosada a roja.

4. Bilirrubina

Orinas espumosas, oscuras o de color amarillo a pardo, sugieren la presencia de bilirrubina conjugada. La orina normal no contiene bilirrubina. Los pacientes ictericos con enfermedad hepatocelular, como hepatitis, o enfermedad obstructiva, como cirrosis biliar, pueden tener bilirrubina conjugada en la orina. El método empleado por las tiras reactivas para determinar bilirrubina se basa en la reacción de diazoación.



Los resultados negativos de orinas sospechosas y los resultados positivos cuestionables, provenientes de orinas coloreadas, deben ser confirmados empleando tabletas de Ictotest (Ames Division, Miles Laboratories). El Ictotest emplea la misma reacción de diazoación que las tiras reactivas. Se pueden encontrar resul-

tados falsos negativos en orinas no frescas, porque la bilirrubina urinaria puede hidrolizarse u oxidarse por acción de la luz.

5. Urobilinógeno

El urobilinógeno es un compuesto coloreado, resultado de la reducción de la bilirrubina por acción de las bacterias en el intestino. Las orinas normales contienen pequeñas cantidades de urobilinógeno. El urobilinógeno se encuentra disminuido en niños deficientes en bacterias intestinales, en pacientes después de la administración de antibióticos que reducen la flora intestinal y en pacientes con enfermedades obstructivas hepáticas. Se encuentra un aumento del urobilinógeno en pacientes con anemias hemolíticas (aumento de formación de bilirrubina) y disfunción hepática. El método empleado por las tiras reactivas para la determinación del urobilinógeno varía, según el fabricante. Algunos emplean la reacción de Ehrlich, usando p-dimetilaminobenzaldehído en una reacción simple de color con el porfobilinógeno. Esta reacción no es específica para urobilinógeno, pudiéndose encontrar resultados falsos positivos con otros compuestos que también reaccionan con el reactivo de Ehrlich. Otros emplean una reacción específica para el urobilinógeno: el urobilinógeno reacciona con un compuesto de diazonio, produciéndose un color rojo. Para la determinación del urobilinógeno es necesario un espécimen fresco porque el compuesto es sensible a la luz. El espécimen preferido para la determinación cuantitativa del urobilinógeno urinario es una orina recolectada durante las dos primeras horas de la tarde. Este tiempo de recolección se debe a los patrones de excreción diurna del urobilinógeno.

6. Nitritos

El ensayo de nitritos se emplea en los laboratorios de uroanálisis para detectar bacteriuria. El método empleado en las tiras reactivas para determinar nitritos se basa en la reducción de nitratos a nitritos por la acción enzimática de ciertas bacterias presentes en la orina. En un pH ácido, los nitritos reaccionan con el ácido p-arsanílico formando un compuesto de diazonio, el cual a su vez reacciona con N-(1-naftil)etilendiamina, produciendo un color rojo. El ensayo de nitritos debe realizarse en

especímenes recolectados en la primera orina de la mañana o en una muestra de orina recolectada después de cuatro horas o más, a partir de la última evacuación de la vejiga, con el fin de permitir que durante este tiempo los microorganismos metabolicen el nitrato dentro de la vejiga. En orinas pasadas o viejas, el ensayo de nitritos puede ser positivo como resultado de la contaminación con bacterias después de la micción. La prueba de nitritos es específica para organismos gram negativos. Sin embargo, se pueden obtener resultados falsos negativos si están presentes microorganismos como enterococos, estreptococos o estafilococos.

7. Esterasa leucocitaria

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

8. Melanina

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

Examen microscópico de orina

Una identificación microscópica precisa del sedimento urinario es importante para el reconocimiento temprano de infecciones, procesos inflamatorios y neoplasias que pueden afectar el tracto urinario.

Microscopía de campo claro de una orina no teñida

La microscopía de campo claro no coloreada emplea luz reducida para delinear los elementos más translúcidos de la orina, como cilindros hialinos, cristales y filamentos de moco. La identificación precisa de leucocitos, macrófagos, células del epitelio tubular renal y células que contienen inclusiones virales puede ser muy difícil en preparaciones no coloreadas. Para confirmar los resultados deben emplearse técnicas citológicas y preparaciones teñidas.

Procedimiento

La orina debe examinarse mientras esté fresca; algunas células y cilindros pueden desintegrarse en un lapso de una a 3 horas. La refrigeración de 2° a 8°C por 48 horas, usualmente, previene la desintegración de las células y de las entidades patológicas. Con propósitos de estandarización, cada espécimen de orina debe concentrarse de 10 a 20 veces. El examen se realiza de la siguiente manera:

- Mezcle bien el espécimen.
- Ponga un volumen fijo (10, 12, o 15 mL) de orina en un tubo de centrífuga.
- Centrifugue a 1500 rpm o aproximadamente 80 G por cinco minutos.
- Extraiga el sobrenadante por decantación cuidadosa o aspiración hasta un volumen fijo: 1 ml y 0.4 mL, son los más comunes. Resuspenda el sedimento golpeando suavemente en el fondo del tubo.
- Ponga una gota del sedimento resuspendido en un área de una lámina estandarizada.
- Examine con bajo poder (10x) y luz atenuada. Ajuste el enfoque fino permanentemente mientras se explora al azar el área cubierta. Durante la revisión evalúe el espécimen en busca de células epiteliales transicionales y escamosas, cristales, moco, bacterias, levaduras y artefactos. Elabore el reporte de acuerdo con los protocolos del laboratorio. La identificación posterior de cilindros, células epiteliales renales, eritrocitos y leucocitos debe ser refinada, empleando el objetivo de 40x.

- Examine, al menos, 10 campos empleando luz tenue. Asegúrese de examinar los bordes porque a menudo los cilindros se encuentran a lo largo de los bordes del cubre objeto. Los cristales anormales, cuando están presentes, deben contarse con el objetivo de bajo poder. Una bacteriuria visible en bajo poder debe ser reportada, por lo menos, con 2+.
- Examine, al menos, 10 campos con alto poder (40x) y reporte con valores numéricos (1x campo, 10 por campo, etc.) eritrocitos, leucocitos y células del epitelio tubular renal.
- Reporte todos los conteos (promedio de 10 campos) y evalúe cualitativamente de acuerdo con la terminología estandarizada.

Cristales

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

Los tipos de cristales urinarios dependen del pH de la orina fresca. La cistina, el ácido úrico, la leucina y la tirosina son los cristales de mayor importancia diagnóstica y, por tanto, deben ser identificados. En general, los cristales de orinas ácidas son de ácido úrico, oxalato de calcio, uratos amorfos, urato de sodio, cistina, leucina, tirosina, colesterol. Los cristales de orinas alcalinas son de fosfato triple, fosfato amorfo, fosfato de calcio, urato de amonio.

Organismos

En un espécimen de orina bien recolectado y procesado, la presencia de organismos es importante desde el punto de vista clínico. Se reportan con frecuencia

bacterias, hongos, parásitos y células infectadas con virus. Con la microscopía de campo claro se detectan con facilidad hongos y parásitos. La identificación exacta de los organismos ayuda en el diagnóstico clínico diferencial de infecciones del sistema urinario. Las preparaciones coloreadas son importantes en la evaluación de organismos, en la identificación de células inflamatorias asociadas, en la valoración de la exfoliación epitelial y en la formación de cilindros renales con el fin de identificar su localización. Se deben emplear técnicas microbiológicas para confirmar y clasificar completamente algunos organismos urinarios.

Bacterias

La orina de individuos normales es estéril y no contiene bacterias. Algunas bacterias pueden estar presentes por contaminación durante la recolección o por almacenamiento prolongado. Se puede determinar una concentración de menos de 10³ bacterias/mL, cuando se han visto bacterias en un espécimen de orina centrifugado, pero no en el espécimen sin centrifugar. La presencia de bacterias en un espécimen sin centrifugar indica que hay una concentración mayor de 10³ bacterias/mL. La presencia de 10⁵ bacterias/ml, o más, sugiere una infección de tracto urinario. Este número corresponde a 10 o más bacterias por campo de alto poder (40x). La identificación de bacterias, cocos o bacilos puede hacerse por microscopía de campo claro o por contraste de fases. Ocasionalmente, hay dificultad para diferenciar bacterias de cristales amorfos.

Hongos

Las infecciones del tracto urinario (ITU) producidas por hongos son comunes en pacientes diabéticos, en aquellos que toman medicamentos desde el nacimiento o en quienes han recibido terapia intensiva con antibióticos o terapia inmunosupresora. Se ha observado un patrón inflamatorio asociado en la mayoría de las ITU de pacientes no inmunocomprometidos. *Candida albicans* es el hongo más común, identificándose como levadura o micelio. En general, la apariencia de gemación de levadura indica que el hongo ha coexistido con el huésped, mientras

que la forma micelar aparece durante la invasión al tejido. Las levaduras de *Candida albicans* son altamente retráctiles y miden de 3 a 5 μm . Suelen confundirse con eritrocitos. A diferencia de los eritrocitos, las levaduras no son lisadas por ácidos.

Parásitos

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

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

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

Eritrocitos

Una orina normal, examinada con objetivo de alto aumento, no debe contener más de unos cuantos eritrocitos. Estas células aparecen en la orina después

de lesiones vasculares o trastornos del riñón o del tracto urinario inferior. La presencia de eritrocitos acompañada de cilindros hemáticos o eritrocitos dismórficos es sugestiva de sangrado del parénquima renal o del glomérulo. La detección urinaria de eritrocitos dismórficos, especialmente acantocitos, es un marcador morfológico importante de sangrado glomerular o tubular. Su cuantificación ayuda en el diagnóstico y manejo del paciente. Cuando se examinen orinas de mujeres, es importante evitar la contaminación con sangre menstrual.

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

Leucocitos

La velocidad de excreción normal de eritrocitos en la orina es de 1 leucocito por cada 3 campos con objetivo de alto aumento, 3 000 células/mL, o más de 200 000 células/hora. Un elevado número de leucocitos (piuria) está asociado a numerosos procesos inflamatorios e infecciosos del tracto urinario. La mayoría de los leucocitos vistos por microscopía de campo claro son neutrófilos segmentados. La identificación de linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos requiere de coloraciones especiales. Se ha mostrado que una velocidad de excreción en exceso de 400,000 células/hora siempre indica una infección del tracto urinario. Esta velocidad corresponde a más de 10 neutrófilos por campo de alto poder. Los pacientes con infecciones activas del tracto urinario superior tienen, frecuentemente, más de 50 neutrófilos por campo de alto poder o una velocidad de excreción de leucocitos que excede 2 o aun 3 millones/hora.

Células del epitelio tubular renal

En el nefrón están alineados varios tipos de células del epitelio tubular renal y las células enfermas o viejas están constantemente siendo arrojadas a la orina. Aunque ellas representan la exfoliación renal real, la presencia de más de dos células del epitelio tubular renal por campo de alto aumento indican daño o lesión activa de los túbulos renales. Hay grandes dificultades en la identificación precisa de las células de los túbulos renales, especialmente, para diferenciarlas de las células mononucleares comúnmente encontradas en la orina. Por microscopía de campo claro, las células tubulares renales son poligonales y de tamaño ligeramente menor que los leucocitos.

Células epiteliales de transición

En la orina normal se pueden encontrar unas pocas células de transición (uroteliales). Un gran número de células transicionales puede indicar procesos inflamatorios de la vejiga, cateterización o estados patológicos malignos. Por microscopía de campo claro, las células transicionales aparecen redondas u ovaladas, miden de 40 a 60 μm , y tienen un núcleo localizado centralmente. Los bordes citoplásmicos de esas células aparecen engrosados y rígidos. Cuando los núcleos de las células transicionales llegan a agrandarse o a tornarse irregulares, se recomienda emplear técnicas citológicas con el fin de detectar enfermedades malignas del sistema urinario.

Células epiteliales escamosas

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

Células caudales

Las células caudales son menores que las escamosas y poseen un apéndice en forma de cola. Proceden de la pelvis renal o cuello vesical.

Cuerpos grasos ovals

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

Espermatozoides

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

Cilindros renales

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

Estas formaciones cilíndricas presentes en la orina reflejan las formas (largas o cortas) y diámetros (delgados y gruesos) de los lúmenes de los túbulos renales en donde se formaron. Su número y sus propiedades cuantificables aportan valiosos indicios sobre la naturaleza de la enfermedad del parénquima renal. Microscópicamente, los cilindros se caracterizan por la apariencia de su matriz (hialina, granular, cérea), por los constituyentes celulares (eritrocitos, leucocitos, o células del epitelio tubular renal) o por el tipo de material particulado embebido en la matriz (gránulos finos, gruesos o fibrina).

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

De manera general, los cilindros se clasifican en hialinos, epiteliales, hemáticos, leucocitarios, céreos, bacterianos, grasos, pseudocilindros y cilindroides.

Grasas

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

Medidas de seguridad y salud ocupacional

Ver Anexo 1.

PRÁCTICA 22

DEPURACION DE CREATININA

DURACIÓN: 1 HORA

Objetivos

- Conocer la fundamentación para la determinación de las pruebas de función renal.
- Conocer el método de depuración de creatinina para relacionarlo con el estado renal del paciente.

Generalidades

El riñón es el órgano vital para mantener la homeostasis interna, el equilibrio hidroelectrolítico y el ácido-base, la presión arterial, el metabolismo de proteínas, purinas, calcio y fósforo y la producción de eritropoyetina. El riñón también interviene en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y de varias hormonas y oligoelementos, mediante múltiples procesos fisiológicos que se reflejan en la producción de orina en el periodo de 24 horas, a través de la hemodinámica renal, cuyo parámetro fundamental es la filtración glomerular –valores normales de 120 ± 15 mL/minuto (10% menor en la mujer). Sus niveles determinan las clasificaciones del grado o estadio de la insuficiencia renal crónica. La filtración glomerular decae con los años: en los adultos de más de 60 años se espera 50% (60 mL/minuto) del parámetro de referencia. Ante un trasplante renal de riñón único, tanto en el receptor como en el donante vivo, se espera un nivel similar, que sería el límite entre suficiencia e insuficiencia.

La elevación en sangre de la creatinina es un indicador de insuficiencia renal crónica. Una elevación menor representa un decremento importante de la filtración glomerular, sobre todo en las etapas intermedias; es decir, la elevación de 2 a 4 mg/dL de creatinina sérica manifiesta una pérdida de más de 8 mL/minuto de

filtración glomerular, lo cual es de mal pronóstico. Hay que señalar que esta no se recupera una vez instalada la insuficiencia renal crónica, sino que va en constante descenso, de ahí que se habla de la reciprocidad de la creatinina, que se extrapola con el tiempo (meses). La enfermedad renal progresiva crónica es paralela a la fibrosis renal y a la disminución del tamaño de los riñones. Por debajo de 30 mL/minuto se inician los síntomas propios del estado urémico que puede evolucionar a coma urémico y a la muerte, a menos que el paciente ingrese a un programa de diálisis crónica o reciba un trasplante renal. Estos se indican cuando la filtración glomerular tiene valor por debajo de 5 a 10 % de los niveles normales.

Existen diversas técnicas de laboratorio para esta medición. Inicialmente se utilizaba la llamada hemodinámica renal, mediante la infusión y medición de la inulina, ahora en desuso. Después se introdujeron técnicas de radioisótopos precisos, cuya realización requiere de personal capacitado y con experiencia en interpretar la información que se obtiene con el gammagrama renal, así sea con el equipo más moderno. En los últimos años, se ha puesto en práctica, con resultados aceptables, la valoración de la cistatina C y del iohexol. Si bien en nuestro país esta última técnica ha sido poco difundida y, hasta el momento, costosa. Lo anterior lleva a reconocer y a aceptar que la técnica más apropiada, confiable, sin limitaciones técnicas y económicas es medir la filtración glomerular mediante la depuración de creatinina en orina de 24 horas, cuya principal indicación es que el paciente conozca el procedimiento y coopere en coleccionar correctamente la orina. La depuración de creatinina es una prueba para medir la función glomerular, debido a que la creatinina formada de forma endógena en el músculo se libera a la circulación de forma muy constante; es removida por el riñón casi exclusivamente por filtración glomerular (con una cantidad muy pequeña de filtración tubular). La función de esta prueba es detectar una lesión renal, de preferencia durante las primeras etapas del curso del trastorno y localizar el sitio de la lesión y cuantificar el grado de los daños.

La medición de la filtración glomerular indica el grado de funcionalidad del sistema renal. No obstante el desarrollo de nuevas tecnologías, en la mayoría de los países, la técnica más apropiada y aceptada para medir la filtración glomerular es la

depuración de creatinina en orina de 24 horas, que tiene la ventaja de ser confiable, fácil de reproducir, no tiene limitaciones técnicas y, sobre todo, es económica.

Materiales

Muestra biológica

1. El día que se inicie la colección de la orina se debe eliminar la primera orina.
2. Reunir la orina en un recipiente (plástico, vidrio, etc.) limpio y seco.
3. Colectar toda la orina del día (tarde y noche) sin excepción. En caso de que se olvide alguna muestra, suspender e iniciar al siguiente día.
4. Se debe incluir la primera orina del siguiente día y acudir al laboratorio en ayuno.

Material de laboratorio

- 1 micropipeta de 1,000 μL
- 1 micropipeta de 200 μL
- 1 piseta con agua desionizada o destilada
- 2 celdas de plástico de 3 mL
- Tubos de vidrio de 13 x 100
- Puntas para micropipeta
- Gradilla

Equipo

- Espectrofotómetro o fotómetro termostable a 37°C con filtro de 490-510 nm
- Centrífuga
- Incubadora de agua o seca a 37°C

Medidas de seguridad y salud ocupacional

Ver Anexo 1.

Cálculos

El paciente, en ayuno, debe llevar la orina al laboratorio personalmente para que, además, se le tome una muestra de sangre que mida la creatinina sérica. Con la orina colectada, se toma una alícuota y se dosifica la concentración de creatinina en orina y mediante la siguiente fórmula se obtiene la filtración glomerular:

$$\text{Depuración de creatinina} = \frac{U \times V}{P}$$

Donde:

U = creatinina en orina (mg/dL).

P = creatinina en plasma (mg/dL).

V = volumen urinario (mL/minuto), que se obtiene de dividir el volumen urinario colectado entre 1 440 (no olvidar que los riñones en condiciones normales producen 1 mL de orina por minuto y el día completo tiene 1 440 minutos).

Ejemplo:

$$\frac{60 \text{ mg/dL} \times 1 \text{ mL/minuto}}{2.0 \text{ mg/dL}} = 30 \text{ mL/minuto}$$

Fórmula que toma en cuenta la superficie corporal:

$$SP = \text{Talla (cm)} + \text{Peso (kg)} - 60 / 100$$

La fórmula para calcular el aclaramiento es:

$$UCr \text{ (mg/dl)} \times Vu \text{ (ml)} \times 1,73 / SCr \text{ (mg/dl)} \times 1\,440 \times S$$

Con lo que se obtiene la filtración glomerular en mililitros/minuto.

- ACr es aclaramiento de creatinina.
- UCr es creatinina en orina.
- Vu es volumen de orina.
- SCr es creatinina en suero.
- S es superficie corporal. $S = (P \times T) 0,5 / 60$ Los valores normales están entre 88 y 128 ml/min.

Estimación usando la fórmula Cockcroft-Gault

La fórmula Cockcroft-Gault puede emplearse para estimar el aclaramiento de creatinina, que a su vez estima el IFG:

$$\text{Aclaramiento de creatinina} = \frac{(140 - \text{edad}) \times \text{peso (en kilogramos)}}{72 \times \text{creatinina en plasma (en mg/dl)}} \times 0.85 \text{ si es mujer}$$

Intervalo de referencia

En los hombres, el índice normal de depuración de creatinina es 97 a 137 mL/min.

En las mujeres es de 88 a 128 mL/min.

Resultado

Significado clínico

Los estadios tempranos de la enfermedad renal crónica son silenciosos; solo pueden detectarse mediante exámenes de laboratorio. La evaluación de la enfermedad renal crónica depende del nivel actual de la función renal. La velocidad de fil-

tración glomerular (vFG) es considerada la prueba standard de oro para identificar el nivel de función renal, tanto en individuos sanos como afectados.

Los estadios de la enfermedad renal crónica, de acuerdo con la velocidad de filtración glomerular, son:

- Estadio 1: normal = velocidad de filtración glomerular ≥ 90 mL/min/1,73m².
- Estadio 2: daño renal leve = 60-89 mL/min/1,73m².
- Estadio 3: daño moderado = 30-59 mL/min/1,73m².
- Estadio 4: daño severo = 15-29 mL/min/1,73m².
- Estadio 5: falla renal = < 15 mL/min/1,73m².

La velocidad de filtración glomerular es una medición directa de la capacidad de filtración glomerular; la vFG está disminuida en los pacientes con glomerulopatías, por lo que existe un aumento de las proteínas en orina. La velocidad de filtración declina alrededor de 10% por década, después de los 50 años de edad. Algunos pacientes con una significativa velocidad de filtración tienen un ligero aumento de la creatinina sérica. La depuración está calculada con base en la superficie de área del paciente. El porcentaje de error estimado en la determinación de la depuración, usando orina de 24 horas, está entre 10 y 15 por ciento.

UNIDAD 9. PRUEBAS DE FUNCIÓN HEPÁTICA Y VÍAS BILIARES

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

Diversos experimentos han demostrado que el hígado tiene una gran capacidad para regenerarse o, en su defecto, funcionar con algunas áreas dañadas, sin mostrar evidencias de daño. Por lo anterior, se ha destacado la importancia de las pruebas de función hepática para evidenciar daños hepáticos tempranos o incluso tardíos. De igual forma, una alteración de las pruebas de función hepática no necesariamente indica daño en el órgano, ya que algunas enfermedades, ajenas al hígado, ocasionan trastornos en algunas pruebas de la función hepática.

El término Pruebas de Función Hepática (LFT, por sus siglas en inglés) se aplica a una variedad de pruebas de sangre para averiguar el estado general del hígado y del sistema biliar. Las pruebas rutinarias de función hepática pueden dividirse entre las que son valores reales de la función hepática, como seroalbúmina o tiempo de protrombina; y aquellas que son simplemente marcadores de la enfermedad hepática o del sistema biliar, como las diferentes enzimas hepáticas. Además de las pruebas hepáticas usuales, los médicos podrían ordenar pruebas hepáticas más específicas que, cuando son positivas, pueden determinar la causa específica de una enfermedad hepática.

Determinaciones que forman el perfil

Las determinaciones que forman este perfil tienen la característica de evaluar una función del hígado.

Función excretora

Participa en la elaboración de la bilis y su excreción hacia el intestino. Participa en la secreción de la bilis con productos provenientes de la actividad de células hepáticas: bilirrubina, colesterol, sales biliares, metales pesados, colorantes y fosfatasa alcalina.

Función metabólica

a) Biotransformación y eliminación de drogas, b) metabolismo del amonio: participa en la destoxificación del organismo al realizar las reacciones de conjugación, metilación, oxidación, reducción y remoción de amoniaco, c) metabolismo de los carbohidratos, d) metabolismo lipídico y e) metabolismo de aminoácidos y proteínas.

Función de síntesis

a) Proteínas plasmáticas, b) factores de la coagulación, c) lípidos y lipoproteínas y d) urea.

Función hematológica

Cuantificación de fibrinógeno, tiempo de protrombina, haptoglobina, hemopexina, fibrinógeno.

Enzimas hepáticas

Existen dos categorías generales de enzimas hepáticas. El primer grupo incluye a las enzimas transaminasas: alaninoaminotransferasa (ALT, por sus siglas en inglés)

y la aspartato-aminotransferasa (AST, por sus siglas en inglés), antes conocidas como SGPT y SGOT (por sus siglas en inglés), y a la deshidrogenasa láctica (isoenzima 5). Estas son enzimas indicadoras del daño a la célula hepática:

- ALT (TGP)
- AST (TGO)
- LDH₅

El segundo grupo incluye ciertas enzimas hepáticas, como la fosfatasa alcalina (ALP) y la gammaglutamiltranspeptidasa (GGT, por sus siglas en inglés) las cuales indican obstrucción del sistema biliar, ya sea en el hígado o en los canales mayores de la bilis que se encuentran fuera de este órgano:

- GGT
- ALP
- 5' nucleotidasa

A continuación, se realizará la determinación de las pruebas que integran un perfil de pruebas de funcionamiento hepático.

PRÁCTICA 23

DETERMINACIÓN DE BILIRRUBINA TOTAL, DIRECTA E INDIRECTA

DURACIÓN: 90 MINUTOS

Objetivos

- Conocer el fundamento del método Malloy-Evelyn para la determinación de bilirrubina en una muestra biológica.
- Establecer los intervalos de referencia de la bilirrubina total y directa para compararlos con el valor de nuestra muestra problema a analizar.

Generalidades

La bilirrubina se origina por degradación del grupo hem de la hemoglobina, como consecuencia de la destrucción de los glóbulos rojos en el sistema retículo endotelial. En una primera etapa se forma, por acción de una oxigenasa, un grupo formilo, con lo que se rompe el anillo tetrapirrólico del hem, formándose el compuesto denominado biliverdina que, en una etapa posterior y por acción de una reductasa, se transforma en bilirrubina. Desde un punto de vista analítico y clínico, interesa conocer los niveles de bilirrubina total y diferenciar cuantitativamente la bilirrubina libre o prehepática, que aumenta principalmente en procesos de tipo hemolítico, de la bilirrubina conjugada o hepática que está incrementada en la disfunción hepática y, más concretamente, en fallos de los mecanismos de su eliminación, a través del sistema biliar, cuyo primer paso es introducirse del hepatocito a los canalículos biliares.

Ictericia

La ictericia es una condición general provocada por el metabolismo anormal o la retención de la bilirrubina. La ictericia produce una coloración amarilla en la piel,

membranas mucosas y escleras. Se puede observar la ictericia típicamente con niveles de bilirrubina sérica de aproximadamente 50 mg/dL. Los tres tipos principales de ictericia son: la prehepática, la hepática y la poshepática.

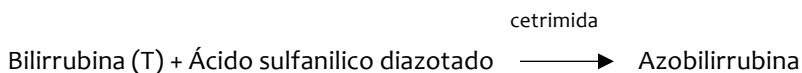
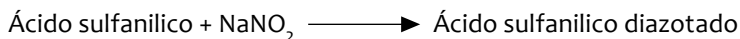
La ictericia prehepática es el resultado de las anemias hemolíticas agudas o crónicas. La ictericia hepática incluye los trastornos del metabolismo de la bilirrubina y los defectos en el transporte tales como la enfermedad de Crigler-Najer (enfermedad congénita por deficiencia de la UDP glucuroniltransferasa, con aumento en la bilirrubina no conjugada), el síndrome de Dubin-Johnson (deficiencia en la posconjugación de la bilirrubina a diglucoronilo de bilirrubina, con grandes aumentos de la bilirrubina conjugada) y la enfermedad de Gilbert (causada por un defecto en el transporte de la bilirrubina no conjugada, sin elevación de bilirrubina conjugada), así como la ictericia fisiológica del recién nacido (causadas por lo general por deficiencia en la glucuroniltransferasa) y enfermedades que provocan la injuria o la destrucción hepatocelular. La ictericia hepática incluye los desórdenes caracterizados por daño hepatocelular o necrosis, tales como hepatitis o cirrosis. Se ha promocionado la medición de la bilirrubina delta como una mejor manera de evaluar la hiperbilirrubinemia resultante de la enfermedad hepática obstructiva. La fracción tiene una vida media sérica mayor que las otras fracciones. Si se encuentra elevada en concentraciones significativas, puede provocar un descenso aparentemente más lento en la caída de la bilirrubina sérica, dando la falsa impresión de una falta de progreso a medida que la enfermedad hepática responde al tratamiento.

La ictericia poshepática es causada generalmente por una enfermedad obstructiva biliar provocada por espasmos o contracciones del tracto biliar, la oclusión dúctil por cálculos o compresión por enfermedad neoplásica. Puesto que en estas enfermedades las funciones hepáticas de transporte y conjugación de la bilirrubina son normales, el incremento mayor en la bilirrubina sérica implica a la fracción conjugada. Debido a la imposibilidad de ser excretada adecuadamente por el hígado, en estos desórdenes aumenta la fracción de bilirrubina conjugada en el suero, con el resultado de la aparición de bilirrubina en la orina. Si la enfermedad hepatocelular es suficientemente severa para provocar ictericia, se

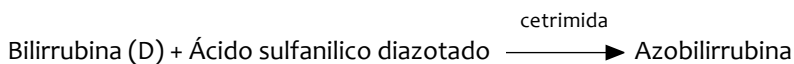
aumentan tanto las fracciones de bilirrubina conjugadas como de no conjugadas. La razón es el daño general en el metabolismo de la bilirrubina.

Casi todas las técnicas de cuantificación de la bilirrubina se basan en la reacción de Malloy-Evelyn (DMSO), que valora colorimétricamente por la formación de azobilirrubina, de color rojo cereza, cuando a la bilirrubina se le hace reaccionar en determinadas condiciones con el ácido sulfanílico diazotado. La bilirrubina conjugada, muy polar, reacciona en medio acuoso con el reactivo de diazotación, por lo que se le llamó directa pues, al poner en contacto el suero y el reactivo, aparecía directamente el color. Sin embargo, la bilirrubina libre, poco polar, no da directamente la reacción y es preciso añadir un tercer reactivo –que inicialmente fue el metanol– para que produzca la reacción de diazotación con la consiguiente aparición del color; por este motivo se llamó bilirrubina indirecta.

En el método modificado de punto final, el ácido sulfanílico reacciona con nitrito de sodio (NaNO_2) para formar ácido sulfanílico diazotado. En presencia de acelerador (cetrimida), la bilirrubina conjugada, o no conjugada, reacciona con el ácido sulfanílico diazotado para formar azobilirrubina.



En ausencia de acelerador solo la bilirrubina conjugada reacciona para dar azobilirrubina:



Escriba la reacción con símbolos químicos (formula desarrollada):

Materiales

Material biológico

Suero: la estabilidad de la muestra, una vez separada de los hematíes y protegida de la luz, es de tres meses a -20°C, cuatro días entre 2-8°C o un día entre 20-25°C.

Material

- Tubos de ensayo de 13 x 100 mm
- Micropipetas de 1.0 mL
- Micropipeta de 200 mL
- Puntas para micropipeta
- Gradilla

Medidas de seguridad y salud ocupacional

Ver Anexo 1.

PERFIL ENZIMÁTICO HEPATOBILIAR

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

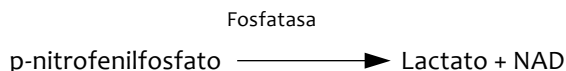
La actividad enzimática varía de acuerdo con la ubicación celular. Por lo tanto, el patrón de elevación enzimática es útil para detectar y diferenciar diversas enfermedades. Además, existen varias isoenzimas en las que se observa una leve diferencia estructural de la enzima, que depende del tejido primario en el cual se sintetiza. Esta diferencia estructural permite separar las enzimas totales en todas sus formas isoenzimáticas. Por este motivo, en vez de la determinación de una sola enzima, las baterías de pruebas enzimáticas, que constan del análisis de dos o más enzimas o isoenzimas, en vez de la determinación de una sola enzima, ofrecen una mayor sensibilidad y especificidad diagnósticas para la detección de afecciones.

Las enzimas que se solicitan para el diagnóstico de afecciones hepáticas incluyen AST, ALT, GGT y ALP. De ellas, la AST y la ALT se elevan más en afecciones hepatocelulares, mientras que la GGT y la ALP indican, con mayor frecuencia, afecciones hepatobiliares. A medida que se cuente con tecnología más avanzada, los análisis enzimáticos ofrecerán una sensibilidad y especificidad diagnósticas aún mayores, con capacidad para distinguir y detectar mejor las isoenzimas y las isoformas de las mismas. La importancia radica, indudablemente, en la selección adecuada de las metodologías más modernas, específicas y sensibles para evaluar las enzimas presentes.

Para las determinaciones enzimáticas se emplean fundamentalmente dos clases de métodos: 1) directos y 2) indirectos.

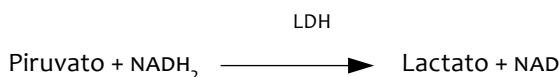
a) Métodos directos

Se mide la desaparición de los sustratos enzimáticos o la aparición de uno de los productos de la reacción, por ejemplo:



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

Este tipo de reacciones debe medirse a longitudes de onda específicas para el compuesto cuya desaparición se está controlando, por ejemplo:

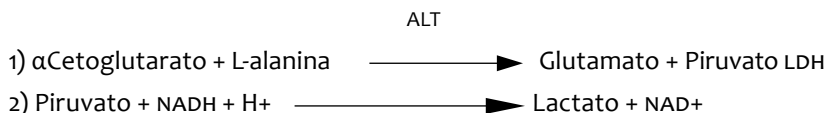


En estas reacciones, lo que se mide es la oxidación de la coenzima en su forma reducida (NADH_2), que absorbe específicamente a 340 nm. Por la acción de la deshidrogenasa, la coenzima pasa a su forma oxidada (NAD), que se absorbe a 340 nm (método uv).

b) Métodos indirectos

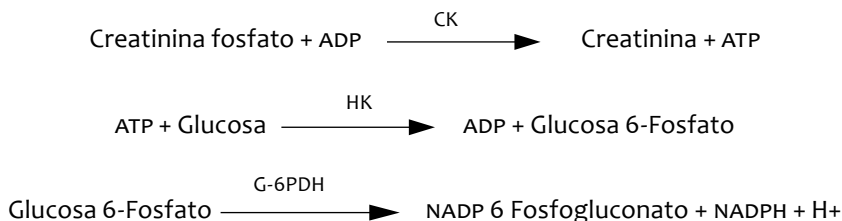
Como su nombre lo indica, la actividad de la enzima se determina solo en forma indirecta. Para ello, es necesario acoplar dos o más reacciones, en una de las cuales intervenga la enzima que se desea determinar. Esta cataliza generalmente la transformación de un sustrato a un metabolito intermedio (producto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

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



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

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



Para medir la actividad de la enzima que cataliza la fosforilación del ADP en ATP, es decir, creatinina cinasa, es necesario emplear el ATP resultante, como donador de grupos fosfato que requiere la hexocinasa (HK), para formar glucosa 6-fosfato. Este compuesto tiene que emplearse todavía en una tercera reacción, como sustrato de otra enzima auxiliar, la deshidrogenasa de glucosa 6-fosfato (G-6PDH). Esta segunda enzima auxiliar es la que a su vez reduce la coenzima NADP (en su forma oxidada), hasta NADPH_2 y es la que puede ser medida a una longitud de onda a 340 nm.

PRÁCTICA 24

DETERMINACIÓN DE FOSFATASA ALCALINA (ALP)

DURACIÓN: 40 MINUTOS

Objetivos

- Demostrar el manejo adecuado de la técnica para la determinación de la enzima fosfatasa alcalina ALP en una muestra biológica
- Establecer los intervalos normales de referencia de las actividades de esta enzima para compararlos con el valor de nuestra muestra problema a analizar.

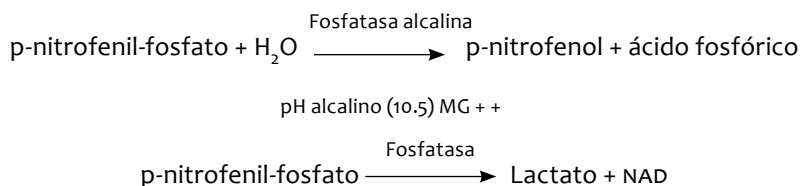
Generalidades

La fosfatasa alcalina se encuentra ampliamente distribuida en los órganos del cuerpo humano. Fuentes de importancia clínica son el hígado, los huesos, la placenta, el intestino, el bazo y el riñón. Aunque se desconoce su función biológica precisa, aparentemente participa en el transporte de membrana, ya que está unida a la membrana celular. En el hígado, la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) se localiza en la membrana celular que une el borde sinoidal de las células del parénquima a los canalículos biliares. En los huesos, la actividad de la ALP se localiza en la membrana celular que une el borde sinoidal de las células del parénquima a los canalículos. En los huesos, su actividad se confina a los osteoblastos. El aumento de actividad de fosfatasa alcalina en suero se observa en diversas afecciones; sin embargo, su significado clínico se relaciona principalmente con la detección de enfermedades óseas y hepáticas. La actividad de la ALP es útil para el diagnóstico diferencial de enfermedades hepáticas. La fosfatasa alcalina suele elevarse más en caso de afecciones de los conductos biliares, que en las que se produce principalmente la lesión hepatocelular. Por lo tanto, en la enfermedad hepática colestática u obstrucción hepatobiliar, la ALP suele incrementarse hasta 10 o 15 veces más que los valores normales. En general, solo se observan leves elevaciones de dos a tres veces los

valores normales, en afecciones hepatocelulares como la hepatitis. Además, la síntesis de esta enzima se estimula por la colestasis. Otras afecciones hepáticas que también incrementan la actividad de la fosfatasa alcalina son la mononucleosis infecciosa, la colangiolutis, la cirrosis total, el carcinoma hepatocelular primario y el carcinoma hepático metastático secundario. La ALP también se sintetiza en las células osteoblásticas, en donde se produce la formación de hueso. Por tanto, en afecciones óseas con incremento de actividad osteoblástica, en general los niveles de fosfatasa alcalina se elevan. En algunas afecciones que incluyen hipotiroidismo, escorbuto, hipofosfatemia, Kwashiorkor (niño rojo), cratinismo y anemia grave, se observa reducción de la actividad de fosfatasa alcalina. Es muy complicada la interpretación de la medición de la fosfatasa alcalina sérica, debido a que la actividad de la enzima puede aumentar en ausencia de enfermedad hepática. También se incrementa la actividad de la fosfatasa alcalina sérica durante la pubertad debido al crecimiento acelerado de los huesos y, durante el tercer trimestre del embarazo debido a la liberación de la fosfatasa alcalina por la placenta.

La fosfatasa alcalina realmente es un grupo de enzimas que hidrolizan los ésteres de monofosfatos a un pH alcalino. El pH óptimo para estas enzimas es aproximadamente de 10. No se conocen los sustratos naturales para la fosfatasa alcalina. La actividad más alta de la fosfatasa alcalina se observa en el hígado, los huesos, el intestino, el riñón y la placenta; se han identificado por lo menos 11 isoformas diferentes de la fosfatasa alcalina en el suero. Puesto que la fosfatasa alcalina contiene normalmente cantidades significativas de ácido siálico, la mayoría de estas formas múltiples de la enzima son el resultado de diferentes grados de sialización. Se sabe que la enzima producida por la placenta tiene una composición proteica diferente de las otras composiciones enzimáticas. En general, las fosfatasas catalizan la hidrólisis de los ésteres del ácido fosfórico. En función de los valores de pH a los que logran su actividad óptima, se distinguen dos tipos de fosfatasas: 1) la alcalina y 2) la ácida.

Para la determinación de las fosfatasas según Bessey, Lowry y Brock, se utiliza como sustrato p-nitrofenilfosfato, que por la acción de la enzima se escinde en p-nitrofenol (cromógeno amarillo) y ácido fosfórico.



Escriba la reacción en forma desarrollada:

Materiales

Muestra biológica

Suero, plasma heparinizado. La actividad de la enzima debe determinarse rápidamente o bien separar el suero de los hematíes. La pérdida de la actividad enzimática es menor de 10% entre dos a tres días a 15-25°C o durante un mes a -20°C.

Material

- Tubos de ensaye de 13 x 100 mm
- Micropipetas de 1.0 mL
- Micropipeta de 50 mL
- Puntas para micropipeta
- Gradilla

Equipo

- Espectofotómetro o fotómetro termostable a 37°C, con filtro de 405 nm
- Centrífuga

Medidas de seguridad y salud ocupacional

Ver Anexo 1.

PRÁCTICA 25

DETERMINACIÓN DE GAMMA-GLUTAMILTRANSFERASA (GGT)

DURACIÓN: 40 MINUTOS

Objetivos

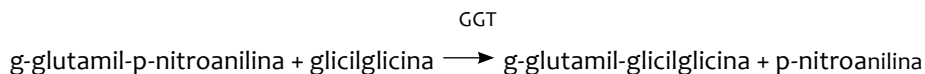
- Demostrar el manejo adecuado de la técnica para la determinación de la gamma glutamiltransferasa en una muestra biológica.
- Establecer los intervalos de referencia de la enzima GGT y compararlos con el valor de la muestra problema a analizar.

Generalidades

La GGT (o g-GT) es una enzima localizada en la membrana, que juega un papel importante en el metabolismo del glutatión y en la reabsorción de los aminoácidos del filtrado glomerular y de la luz intestinal. El glutatión (g-glutamilcisteinilglicina), en presencia de la GGT y un aminoácido o péptido, transfiere el glutamato al aminoácido formando un enlace peptídico en el ácido g-carboxílico, creando, por consiguiente, cisteinilglicina y el péptido g-glutamil correspondiente. Aunque la mayor actividad de la GGT se presenta en el tejido renal, la elevación de la GGT generalmente es un indicador de la enfermedad hepática. La GGT sérica se eleva antes que las otras enzimas hepáticas en enfermedades como la colecistitis aguda, la pancreatitis aguda, la necrosis hepática aguda y subaguda, así como en neoplasias de sitios múltiples que cursan con metástasis hepáticas. Puesto que la GGT es una enzima microsomal hepática, la ingestión crónica de alcohol o drogas –como los barbitúricos, los antidepresivos tricíclicos y los anticonvulsivantes– inducen la producción de enzimas microsomales. Estas elevaciones inducidas por drogas preceden cualquier otro cambio en las enzimas del hígado y, si se suspende la ingestión de la droga en ese momento, los cambios del hígado son generalmente

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

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



Metodología

Material biológico

Solamente utilizar suero. No utilizar plasma. La γ -GT es estable en el suero 8 horas a 15-25°C, tres días a 2-8°C y un mes congelado a -20°C.

Material

- Tubos de ensaye de 13 x 100 mm
- Micropipetas de 1.0 mL
- Micropipeta de 200 mL

- Puntas para micropipeta
- Gradilla

Equipo

- Espectrofotómetro ó fotómetro termostable a 37°C con filtro de 405 nm
- Centrífuga

Medidas de seguridad y salud ocupacional

Ver Anexo 1.

PRÁCTICA 26

ASPARTATO AMINOTRANSFERASA-TGO (ASAT) Y ALANINO AMINOTRANSFERESA-TGP (ALAT)

DURACIÓN: 40 MINUTOS

Objetivos

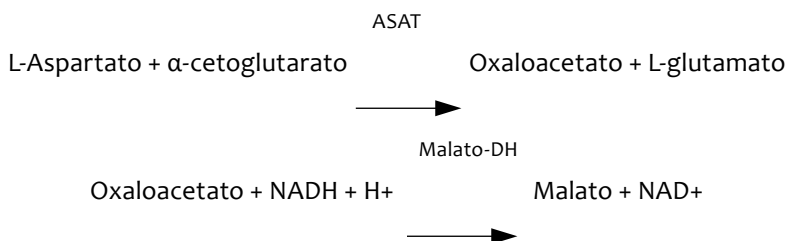
- Aplicar el manejo adecuado de la técnica para la determinación del aspartato aminotransferasa y de la alanino aminotransferasa en una muestra biológica.
- Establecer los intervalos de referencia de las enzimas ASAT y la ALAT para compararlos con el valor de nuestra muestra problema a analizar.

Generalidades

Las transaminasas ASAT y ALAT catalizan la conversión de aspartato y alanina a oxaloacetato y piruvato, respectivamente. En el hígado se encuentran los niveles más altos de ALAT, mientras que la ASAT se encuentra presente en el corazón, músculo esquelético e hígado en cantidades similares. La actividad en el suero, tanto de la ASAT como de la ALAT, aumenta rápidamente durante el comienzo de la ictericia viral y permanece elevada por un lapso de una a dos semanas. En las hepatitis tóxicas también se elevan la ALAT y la ASAT, pero la LDH se eleva mucho más como resultado de la necrosis celular hepática. En los pacientes con hepatitis crónica activa también se observan aumentos en la ASAT y ALAT. La necrosis hepática aguda se acompaña por incrementos significativos en las actividades, tanto la ALAT como la ASAT. El aumento en la actividad de la ALAT es generalmente mayor que el incremento en la actividad de la ASAT. En la cirrosis del hígado las actividades de las transaminasas séricas generalmente no se elevan por encima de 300 U/L, sin importar la causa de la enfermedad crónica. Las elevaciones en las ALAT y ASAT séricas, observadas en el síndrome de Reye,

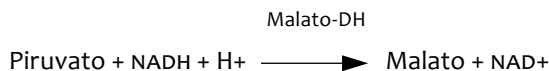
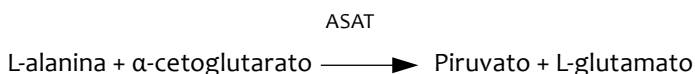
son atribuibles directamente al daño hepático, y el incremento en la ALAT es generalmente mayor que el incremento en la ASAT. También se incrementa la actividad de las transaminasas en la actividad neoplásica. En el diagnóstico de la enfermedad del hígado, la medición de los niveles séricos de ASAT y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

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



Alanino aminotransferasa-TGP

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



Materiales

Muestra biológica

Suero o plasma heparinizado.

Material

- 5 tubos de ensaye de 13 x 100 mm
- 1 micropipetas de 1.0 mL
- 1 micropipeta de 200 mL
- Puntas para micropipeta
- 1 piseta con agua desionizada o destilada
- 2 celdas de plástico de 3 mL
- Gradilla

Equipo

- Espectrofotómetro o fotómetro termostatable a 37°C con filtro de 340 nm
- Cronómetro
- Incubadora de agua o baño seco

Medidas de seguridad y salud ocupacional

Ver Anexo 1.

PRÁCTICA 27

OTROS COMPUESTOS ANALIZADOS EN EL PERFIL HEPÁTICO

DURACIÓN: 90 MINUTOS

Objetivo

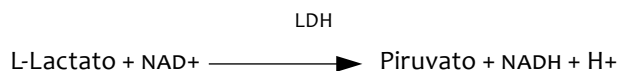
- Conocer otros mensurandos que integran el perfil hepático para incluirlos en el tamizaje de pruebas útiles para el diagnóstico de una hepatopatía.

Lactato deshidrogenasa (LDH)

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

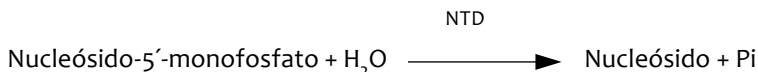
Los valores de lactato deshidrogenasa se utilizan en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades hepáticas tales como la hepatitis viral aguda, la cirrosis y el carcinoma hepático metastásico. También en enfermedades cardíacas.

cas como el infarto del miocardio y tumores de pulmón o de riñón. El reactivo LDH se utiliza para medir la actividad del lactato deshidrogenasa con un método cinético enzimático. En la reacción, la LDH cataliza la oxidación reversible de L-lactato a piruvato con la reducción concurrente de dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD) a dinucleótido de nicotinamida adenina reducido (NADH). La deshidrogenasa láctica está presente en muchos tejidos. La LDH cataliza la interconversión de piruvato y lactato:



5'-Nucleotidasa

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



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

Colesterol

El colesterol sérico está compuesto de colesterol libre y esterificado. Puesto que la esterificación se realiza en el hígado, la enfermedad intrahepática o la obstrucción biliar se caracterizan por un incremento del colesterol libre y, ocasionalmente, por un desplazamiento en el perfil de ácidos grasos libres del suero, aunque el colesterol total permanece usualmente sin modificar. El colesterol total puede disminuir hasta valores inferiores al rango de referencia en la enfermedad crónica, asociada con la destrucción del parénquima celular.

Ácidos biliares

En la enfermedad se altera la secreción y la producción de ácidos biliares. El suero contiene de 1 a 2 mg/mL de ácidos biliares en el adulto sano. En la enfermedad hepatobiliar, las concentraciones de ácidos biliares séricos se pueden elevar hasta 1 000 veces. También se pueden elevar significativamente en otras enfermedades tales como hepatitis, cirrosis, enfermedad hepática inducida por drogas y el hepatoma. Las concentraciones de ácidos biliares séricos se encuentran normales en la enfermedad de Gilbert, la hemocromatosis y la enfermedad poliquística del hígado. La medición de los ácidos biliares es útil para el diagnóstico de la disfunción hepática mínima, cuando los otros parámetros aún están sin modificar.

Triglicéridos (triacilglicéridos)

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

encefalopatía hepática y la hepatitis crónica activa, pero también en el infarto del miocardio, la falla renal aguda, el hipertiroidismo y el feocromocitoma.

Proteínas séricas en la evaluación de la función hepática

Se requiere un hígado sano y en pleno funcionamiento para la síntesis de las proteínas séricas, excepto las gamma globulinas. El hígado tiene la capacidad de duplicar la producción y salida de proteínas durante las enfermedades asociadas con pérdida de proteínas. En consecuencia, no debe sorprender que las mediciones de proteínas totales no se alteren, sino hasta que haya ocurrido una disminución extensiva de la función hepática. La albúmina se disminuye en la enfermedad hepática crónica y, generalmente, se acompaña por un incremento en las globulinas beta y gamma, debido a la producción de IgG e IgM en la hepatitis crónica activa y de la IgM e IgA en la cirrosis biliar o alcohólica, respectivamente. Sin embargo, una disminución en la albúmina sérica no es específica para la enfermedad hepática, puesto que la albúmina también disminuye en la malabsorción, la desnutrición, la enfermedad renal, el alcoholismo y las enfermedades malignas.

La fracción alfa₁ de las globulinas séricas se disminuye en la enfermedad hepática crónica; cuando esta fracción está ausente, o casi ausente, indica que una deficiencia en la alfa₁-antitripsina puede ser la causa de la enfermedad hepática. Las proteínas séricas, globulina alfa₂ y beta se aumentan en la ictericia obstructiva. Este incremento en la alfa₂-globulina y la beta globulina en la ictericia obstructiva está asociado con interferencias en el metabolismo normal de las lipoproteínas. Por consiguiente, no se puede hacer claramente el fenotipo de un desorden lipídico en presencia de enfermedad hepática.

El hígado produce los factores de coagulación y estos pueden disminuir significativamente en la presencia de enfermedad hepática. El fibrinógeno plasmático normalmente está presente en una concentración de 2 a 4 g/L. Una disminución en el fibrinógeno plasmático indica una enfermedad hepática severa y está asociada con concentraciones disminuidas de otros factores de coagulación, especialmente la protrombina. Puesto que la síntesis de la protrombina ocurre en el hígado, y

requiere de la vitamina liposoluble K, se puede incrementar el tiempo de protrombina en la enfermedad obstructiva biliar, la cirrosis o necrosis hepática, la falla hepática, el síndrome de Reye, los abscesos hepáticos, la deficiencia de vitamina K y la hepatitis. Se puede diferenciar la enfermedad intrahepática asociada con una disminución en el factor de coagulación, de la enfermedad obstructiva intrahepática, con una absorción disminuida de vitamina K, observando la respuesta del tiempo de protrombina a la administración exógena de vitamina K.

Urea y amoníaco en la evaluación de la función hepática

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

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

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

Medidas de seguridad y salud ocupacional

Ver Anexo 1.

UNIDAD 10. PERFIL PANCREÁTICO, ALFA AMILASA, LIPASA

ENZIMOLOGÍA CLÍNICA, PERFIL PANCREÁTICO

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

Existen algunas pruebas de función pancreática que, junto con la de grasa en materia fecal, son las más importantes. Las pruebas en suero, como la tripsina inmunorreactiva, son las menos sensibles y menos específicas, a pesar de ser las más fáciles de realizar. La pancreatitis aguda es una de las principales emergencias médicas; el alcoholismo y las enfermedades del tracto biliar son las causas predominantes. Los cambios observados en las enzimas pancreáticas, como amilasa y lipasa, pueden ser de moderados a intensos. Desafortunadamente, solo es posible obtener una estimación de la gravedad del padecimiento mediante los estudios de laboratorio.

Las pruebas de la función pancreática son útiles para el diagnóstico de pancreatitis aguda y crónica. La estimación enzimática en las enfermedades del páncreas es muy valiosa para corroborar una impresión clínica o establecer el diagnóstico. Un estudio preciso requiere estudios de gabinete tales como tomografía axial computarizada, ultrasonografía, pancreatografía e intubación duodenal. En los pacientes con pancreatitis aguda la actividad de la amilasa aumenta a las pocas horas del comienzo de la enfermedad, volviendo a la normalidad de dos a cinco días. La actividad de la lipasa aumenta más lentamente que la amilasa sérica, hasta de 24 a 48 horas, alcanzado su valor máximo en el cuarto día, permaneciendo elevada por más tiempo. Los leucocitos aumentan considerablemente (15 a 30 ml/mmc), predominando la neutrofilia. También se acompaña de hipocalcemia debida a la saponificación de la grasa escindida por la lipasa y se observa hiperglucemia en la mitad de los casos con curva tipo diabético; el aspecto del suero es lechoso en ciertos casos y, a veces, es muy duradero.

En la pancreatitis crónica aumenta más la lipasa, pero con mayor frecuencia está más elevada en enfermos con carcinoma del páncreas. Los datos de laboratorio son comparables a los de la pancreatitis aguda, la diferencia es que –conforme avanza la enfermedad– la hiperenzinemia es cada vez menor, en tanto que la hiperglucemia y la glucosuria con crecientes. La pancreatitis crónica generalmente es la secuela de múltiples brotes de la enfermedad aguda y, normalmente, los resultados de laboratorio no son muy útiles para el diagnóstico. El adenocarcinoma de páncreas, la forma común de la enfermedad maligna, es letal para casi todos los pacientes debido a la naturaleza invasiva del cáncer y su progresión rápida y silenciosa. No existen pruebas adecuadas de escrutinio para el cáncer pancreático y la muerte se presenta típicamente en un lapso de seis meses a un año del diagnóstico. Las neoplasias de los islotes de Langerhans son un reto bioquímico para su diagnóstico. Para establecer el diagnóstico, se requiere realizar pruebas que determinen las hormonas, normalmente producidas en las células del islote de Langerhans, y otros factores.

PRÁCTICA 28

DETERMINACIÓN DE ALFA AMILASA

DURACIÓN: 30 MINUTOS

Objetivos

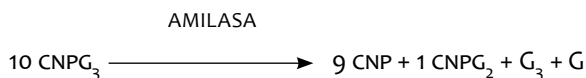
- Conocer la fundamentación del método cinético para determinar amilasa sérica y urinaria.
- Aplicar el manejo adecuado de la técnica para la determinación de la amilasa en una muestra biológica.

Generalidades

La amilasa α (AMS) es una metaloenzima que requiere calcio y pertenece a la clase de hidrolasas. La reacción enzimática que cataliza la amilasa alfa es la hidrólisis aleatoria de enlaces glicosídicos alfa-1,4 internos del almidón, glucógeno y otros polímeros de la glucosa. Los productos de digestión de la amilasa, que es una molécula de almidón lineal que contiene solo enlaces alfa 1,4, son maltosa, maltotrinosa y otras dextrinas. Las principales fuentes tisulares de esta enzima son las glándulas salivales y las células acinares del páncreas. La actividad de amilasa alfa no es específica para estos tejidos, ya que también se encuentra en el epitelio intestinal, las trompas de Falopio, la mucosa del cuello uterino, el endometrio y el tejido del seno durante la lactancia. La principal función de la amilasa alfa se debe a la fracción pancreática, que ayuda a la digestión de almidón, glucógeno y sus productos de descomposición en el intestino delgado. La AMS de la saliva inicia la digestión de almidón en la cavidad oral, pero su acción termina con rapidez a consecuencia del pH ácido del jugo gástrico durante la deglución.

Durante años, los niveles de α -amilasa en suero han evidenciado la necesidad de su determinación para el diagnóstico de pancreatitis aguda. Las primeras técnicas estaban basadas en los cambios de la absorción máxima del complejo entre el almi-

dón y el yodo, ya que la α -amilasa degrada al almidón. Otros métodos están basados en la producción de p-nitrofenol, a partir de sustratos oligosacáridos específicos con grupos bloqueantes en el azúcar terminal. Estos métodos utilizan una variedad de enzimas para hidrolizar la corta cadena de oligosacáridos para producir p-nitrofenol. Estas enzimas contienen una actividad residual de α -amilasa que reduce significativamente la estabilidad del reactivo. Se mide la actividad de la amilasa con un método cinético enzimático. La alfa amilasa hidroliza el 2-cloro-4-nitrofenil-alfa-D-maltotrió (CNPG₃) a 2-cloro-4-nitrofenol (CNP) y forma 2-cloro-4-nitrofenil-alfa-D-maltosido (CNPG₂), maltotriosa (G₃) y glucosa (G) según la siguiente reacción:



La velocidad de formación de 2-cloro-4-nitrofenol (CNP) determinado fotométricamente es proporcional a la concentración catalítica de alfa-amilasa en la muestra ensayada.

Materiales

Muestra biológica

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

Material de laboratorio

- Tubos de ensaye de 13 x 100 mm
- Micropipeta de 1.0 mL
- Micropipeta de 20 mL
- Micropipeta de 200 mL

- Puntas para micropipeta
- Gradilla
- Pipetas graduadas

Equipo

- Espectrofotómetro o fotómetro termostable a 37°C con filtro de 405 nm
- Cronómetro
- Composición del reactivo
- Cloruro sódico
- Acetato cálcico
- Tiocianato potásico
- Ácida sódica CNP_3

Medidas de seguridad y salud ocupacional

Ver Anexo 1.

Cálculos

Suero o plasma $\Delta A/\text{min} \times 3954 = \text{U/L AMS (ALFA AMILASA)}$ Orina $\Delta A/\text{min} \times 7908 = \text{U/L AMS}$.

La unidad internacional (U_I) es la cantidad de enzima que convierte 1 micromol de sustrato por minuto, en condiciones estándar. La concentración se expresa en unidades por litro U/L.

Resultados

Suero $\Delta A/\text{min} \times 3954 = \text{U/L AMS}$

Orina $\Delta A/\text{min} \times 7908 = \text{U/L AMS}$

Valores de referencia

Suero o plasma	hasta 90 U/L
AMS Orina	hasta 450 U/L
AMS	

Interferencias

La hemólisis interfiere en los resultados, la actividad de la enzima puede ser inhibida por agentes quelantes, como citrato o EDTA. Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación de la alfa-amilasa.

PRÁCTICA 29

DETERMINACIÓN DE LIPASA

DURACIÓN: 30 MINUTOS

Objetivos

- Conocer la fundamentación para determinar lipasa sérica.
- Aplicar el manejo adecuado de la técnica para la determinación de la lipasa en una muestra biológica.
- Establecer los intervalos de referencia de la enzima LPS para compararlos con el valor de nuestra muestra problema a analizar.

Generalidades

La lipasa es una esterasa que actúa sobre las uniones ésteres del glicerol emulsificado por las sales biliares y los ácidos grasos; en presencia del ion calcio, y a un pH óptimo de 8.0, hidroliza las grasas (glicéridos), separando en ellas ácidos grasos y dejando libre la glicerina. Es importante en la digestión; su acción es grandemente facilitada por las sales y los ácidos biliares, que emulsifican las grasas y dan lugar a gotas pequeñas de 0.5 a 1.0 micras de diámetro llamadas micelas. El pH intestinal ácido impide que los ácidos grasos liberados formen jabones. Se observa actividad de lipasa en páncreas, mucosa intestinal, estómago, leucocitos y tejido adiposo. Sin embargo, solo la lipasa pancreática tiene significado clínico. Como la lipasa se produce principalmente por las células acinares del páncreas, su utilidad clínica se relaciona, casi de manera exclusiva, con el diagnóstico de laboratorio de pancreatitis aguda. Otras afecciones, en las cuales se incrementa la actividad de lipasa, incluyen intoxicación aguda con alcohol y traumatismos accidentales o quirúrgicos del abdomen.

El primer método utilizado fue descrito por Cherry y Crandall, a base de una emulsión de aceite de oliva. Las esterasas y otras enzimas se inhiben en este

método por la presencia de sales biliares en el sustrato y por el uso de un pH mayor que en el método de Cherry y Crandall. Actualmente, se utilizan métodos modificados del original.

Materiales

Muestra biológica

Suero fresco no hemolizado o plasma.

Material de laboratorio

- Tubos de ensaye de 13 x 100 mm
- Micropipeta de 1.0 mL
- Micropipeta de 10 uL
- Puntas para micropipeta
- Gradilla

Equipo

- Espectrofotómetro o fotómetro
- Cronómetro
- Baño maría

Medidas de seguridad y salud ocupacional

Ver Anexo 1.

UNIDAD 11. PERFIL CARDIACO, CREATINFOSFOQUINASA (CK), ASPARTATO AMINOTRANSFERASA, DESHIDROGENASA LÁCTICA, CK-MB

PERFIL CARDIACO

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

Creatina cinasa

La enzima responsable de la regeneración del adenosín trifosfato (ATP) es la creatina cinasa. Tiene un peso molecular de 85 000 daltones y existe en diversas formas isoenzimáticas. La creatina cinasa (CC) es un dímero, compuesto de las dos

subunidades M (músculo) y B (cerebro). Las tres isoenzimas formadas a partir de estas subunidades se encuentran en el citosol. Estas isoenzimas se abrevian como MM, MB y BB. Si comparamos la actividad de la enzima en varios tejidos, el músculo esquelético tiene por mucho la mayor actividad, poseyendo unas 50,000 veces la concentración de la CC sérica. La isoenzima esquelética predominante es la isoenzima MM, con solo trazas de las isoenzimas MB y BB en la mayoría de las fibras musculares, posiblemente debido a que el reposo en cama reduce la cantidad de enzimas liberadas del músculo.

Isoformas de CC

Las isoenzimas CC-MM (músculo esquelético), CK-BB (tejido cerebral) y CC-MB (híbrido cardíaco) en suero pueden ser fraccionadas en subtipos o isoformas, mediante técnicas de alta resolución tales como electroforesis de alto voltaje o enfoque isoeléctrico. Las isoformas de CC-MM y CC-MB se forman en la sangre mediante la ruptura enzimática irreversible del aminoácido del COOH terminal, un residuo de lisina, de la subunidad M o de las subunidades de las isoenzimas del tejido. Para la CC-MM, esta ruptura involucra la remoción sucesiva de los residuos terminales de lisina de cada subunidad M, dando lugar a tres isoformas llamadas MM₃ (forma tisular o Mlisina Mlisina), MM₂ (o Mlisina M) y MM₁ (o MM). La CC-MB, que tiene una sola subunidad M, consiste de dos isoformas en la circulación: la MB₂ (forma de tejido o Mlisina B) y la MB₁ (o MB).

La actividad de CC del músculo esquelético, medida en unidades internacionales, es aproximadamente de 2000 U/g, comparada con la actividad del músculo cardíaco de 500 U/g. En suero normal, por lo menos, 95% de la CC presente es del tipo MM, que probablemente se deba a fugas del músculo esquelético, particularmente durante la actividad física. Debido a esto, la actividad de la CC sérica en personas activas saludables muestra una distribución asimétrica, inclinada hacia valores más altos. Además, los valores son más bajos en las mujeres que en los hombres; asimismo, son más bajos en la mañana que en la noche. En pacientes hospitalizados los valores tienden a ser más bajos.

Lactato deshidrogenasa

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

La lactato deshidrogenasa (LDH) se encuentra en el citosol de todas las células humanas y, por lo tanto, tendría poca especificidad para el diagnóstico, a no ser por el hecho de que las isoenzimas están presentes en diferentes proporciones en cada tejido. El corazón y los eritrocitos contienen principalmente LDH1 y LDH2, mientras que el músculo esquelético y el hígado contienen LDH5 y, en menor grado, LDH4. El suero normal contiene principalmente LDH2, con menores cantidades de LDH1 y de las otras isoenzimas. Si las enzimas son liberadas del tejido cardíaco al suero, a menudo vemos un cambio en la proporción de LDH1 a LDH2. La vida media de la LDH es diferente para cada isoenzima. La isoenzima 1 (HHHH), tiene una vida media de aproximadamente 100 horas, mientras que la isoenzima 5 (MMMM) tiene una vida media de solo 10 horas. Sin embargo, el componente MB está incrementado en ciertos trastornos musculares, particularmente en la distrofia muscular tipo Duchenne y en la polimiositis.

Aspartato aminotransferasa

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

Proteínas contráctiles

Los marcadores bioquímicos más comúnmente usados para lesión del miocardio están involucrados con el metabolismo de las células, son solubles y están localizados en el compartimento citosólico de las células. Debido a estas propiedades, una gran proporción de estos marcadores citosólicos son liberados rápidamente en la circulación después de una lesión celular. Por contraste, la naturaleza y función de las proteínas estructurales determina que sean solubles. Por consiguiente, una proporción relativamente pequeña está libre en el citosol y disponible para su rápida liberación, poco después de una lesión celular. A esta pequeña proporción disponible para liberación se le denomina reservorio citosólico. A pesar de la desventaja teórica de su insolubilidad, se ha generado bastante interés en las siguientes proteínas estructurales: troponina I, troponina T y las cadenas ligeras de miosina. La base de este interés clínico surge de la identificación y la purificación de formas cardíacas de estas proteínas con alta especificidad tisular y que han permitido el desarrollo de ensayos inmunológicos para la determinación de lesiones miocárdicas, como se discute adelante con mayor detalle.

Miosina, actina y troponina

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

Troponina T (TnT)

La proteína troponina T, de 37 kilodaltones, tiene un reservorio citosólico que constituye cerca de 6% de su concentración intracelular total. A pesar de que se encuentra, tanto en el tejido esquelético como en el corazón, la TnT se usa exitosamente como un marcador para la enfermedad cardíaca isquémica, debido a que un subtipo encontrado en el tejido miocárdico tiene una homología de solamente 60%, con la forma del músculo esquelético. Se han desarrollado anticuerpos altamente específicos que discriminan entre los subtipos de los músculos cardíacos y esqueléticos.

Troponina I (TnI)

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

Cadenas ligeras de Miosina (CLM)

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

PRÁCTICA 30

DETERMINACIÓN DE CREATINCINASA (CK)

DURACIÓN: 40 MINUTOS

Objetivos

- Conocer la fundamentación del método cinético para cuantificar CK.
- Aplicar el manejo adecuado de la técnica para la determinación de la creatin-cinasa.
- Establecer los intervalos de referencia de la enzima CK para compararlos con el valor de nuestra muestra problema a analizar.

Generalidades

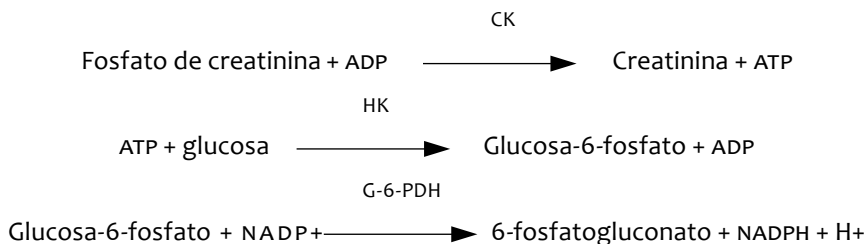
La enzima CK se encuentra más abundantemente en el músculo cardiaco y esquelético. En orden de mayor a menor actividad, otras fuentes en que se encuentra la enzima CK son: cerebro, recto, estómago, vejiga, colon, útero, próstata, intestino delgado y riñón. Se detectan cantidades pequeñas de CK en hígado, placenta y tejido tiroideo. La CK se eleva cuando hay afecciones o enfermedades que afectan el tejido músculo esquelético, el miocardio o el cerebro. Se observan notables incrementos de CK total en infarto agudo al miocardio, en afecciones del músculo esquelético y después de un choque o colapso circulatorio. En general, la CK se eleva en infarto agudo al miocardio y es de gran utilidad clínica para detectarlo. La CK total comienza a incrementarse después de 15 horas de ocurrir un infarto agudo al miocardio. La actividad máxima se observa a las 24 horas y regresa a la normalidad a los tres días. La miocarditis también provoca actividad notablemente alta de CK durante la fase inflamatoria de la afección.

La CK se eleva en diversas enfermedades o lesiones del músculo esquelético. Los valores de creatin-cinasa y sus isoenzimas se utilizan en el diagnóstico y tratamiento de los infartos de miocardio y de miopatías, como la distrofia muscu-

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



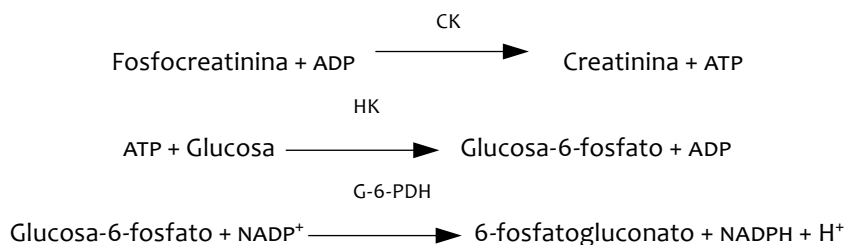
La actividad de CK es de particular importancia en el tejido muscular, donde cataliza la síntesis de fosfato de creatinina, una molécula que almacena enlaces de alta energía. Para efectuar una contracción muscular se utiliza el grupo fosfato para formar ATP a fin de proporcionar de inmediato energía a los músculos. Hay diversos métodos analíticos para determinar la actividad de CK, ya sea mediante la reacción hacia la derecha (creatinina fosfato de creatinina) o la reacción inversa. Estos métodos son análisis de punto final o cinético, en los que se emplean técnicas de espectrofotometría, fluorescencia o bioluminiscencia. El método de referencia para el análisis de CK es el de Oliver y Rosalki, un análisis cinético en el que se emplea la secuencia de reacción inversa.



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

Se mide la actividad de la creatincinasa mediante un método cinético enzimático. En la reacción, la creatincinasa cataliza la transferencia de un grupo fosfato del

sustrato fosfato de creatina al difosfato de adenosina (ADP). La subsiguiente formación de trifosfato de adenosina (ATP) se mide mediante el uso de dos reacciones asociadas, catalizadas por la hexocinasa (HK) y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), lo que produce dinucleótido de nicotinamida adenina reducida (NADH), a partir del dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD). El ensayo (CK) contiene el activador monotioglicerol.



HK = hexocinasa

G-6-PDH = deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato.

La velocidad de formación de NADPH determinado fotométricamente es proporcional a la concentración catalítica de CK en la muestra ensayada.

Materiales

Material biológico

Suero, plasma heparinizado o con EDTA.

Material de laboratorio

- Pipetas de 2 mL y 200 μL
- Pintas para micropipetas
- Tubos de ensayo de 13 x 100
- Gradilla

Equipo

- Fotómetro termostable a 37°C
- Cronómetro
- Incubadora de agua o baño seco

Interferencias

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

Medidas de seguridad y salud ocupacional

Ver Anexo 1.

PRÁCTICA 31**ASPARTATO AMINOTRANSFERASA
(TRANSAMINASA GLUTAMICO OXALACÉTICA)**

DURACIÓN: 40 MINUTOS

Se encuentra descrita en el perfil hepático.

PRÁCTICA 32
DESHIDROGENASA LÁCTICA
DURACIÓN: 40 MINUTOS

Se encuentra descrita en el perfil hepático.

PRÁCTICA 33

CK-MB

DURACIÓN: 40 MINUTOS

Objetivos

- Aplicar el manejo adecuado de la técnica para la determinación de la CKMB en una muestra biológica.
- Establecer los intervalos de referencia de la CKMB para compararlos con el valor de nuestra muestra problema a analizar.

Generalidades

Aunque no son específicos del miocardio, durante varias décadas los marcadores bioquímicos empleados para la confirmación del daño miocárdico han sido la CK y su fracción MB. Estos, aunque son útiles, no permiten identificar adecuadamente a los pacientes con necrosis miocárdica mínima; tienen escasa especificidad en ciertos pacientes (como ejemplo, en aquellos con daño muscular concomitante, enfermedad tiroidea y/o renal, 5% de los pacientes presentan elevación de la fracción MB como consecuencia de miopatía esquelética) y poseen un limitado poder pronóstico.

CKMB representa de 25 a 46% de la actividad CK total en el miocardio y se encuentra en una pequeña proporción en el músculo esquelético. Después de lesión miocárdica, la concentración de CKMB miocárdica se incrementa; niveles elevados también han sido observados en humanos con hipertensión, enfermedad del músculo esquelético, insuficiencia renal crónica, hipertrofia ventricular izquierda, enfermedad de arteria coronaria y uso de cocaína en ausencia de IAM.

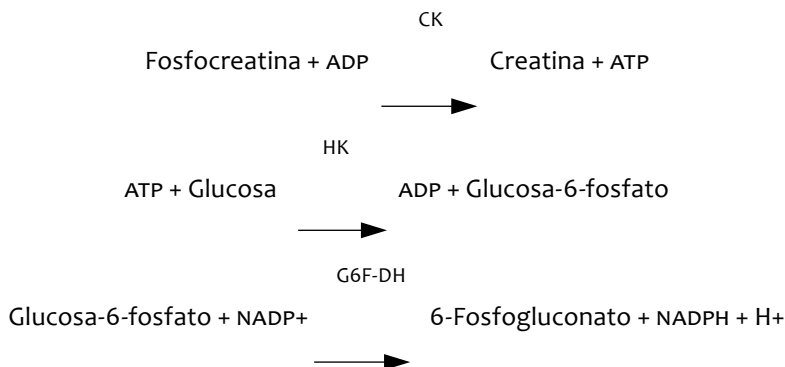
Como se ha mencionado, la medición de CKMB es la prueba que, con frecuencia, se utiliza para el diagnóstico de IAM. Sus niveles plasmáticos incrementan entre 6 y 10 horas después de establecido el infarto, proporcionando una sensibi-

lidad cercana a 90% (en ausencia de trombólisis) y sensibilidad de 36 a 48% cuando se determina en un periodo más corto, alcanzando pico máximo entre las 12 y las 24 horas, retornando a la normalidad entre las 36 y las 72 horas.

Debido a su cinética, se recomiendan las mediciones de CK-MB cada 12 horas como una práctica adecuada. Obteniendo mediciones en un lapso más frecuente, se incrementa la sensibilidad diagnóstica de esta enzima. Los niveles pico de CK-MB desaparecen de manera más rápida que la CK total.

Para hacer diagnóstico específico se utiliza el índice que resulta de dividir la CK total/CKMB, tomando como nivel diagnóstico un valor >3.0 veces. Sin embargo, el valor aislado de estas enzimas resulta poco útil y es práctica común realizar una curva enzimática de 24 horas, a fin de corroborar el diagnóstico de IAM.

El anticuerpo anti CK-M inhibe completamente la actividad de la CK-MM y la subunidad (M) de la CK-MB. La actividad de la CK-B no inhibida se determina según las siguientes reacciones: la velocidad de formación de NADPH, determinada fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de CK-B en la muestra ensayada.



Materiales

Material biológico

Suero, plasma heparinizado o con EDTA.

Material de laboratorio

- Pipetas de 2 mL y 200 μ L
- Pintas para micropipetas
- Tubos de ensayo de 13 x 100
- Gradilla

Equipo

- Fotómetro termostable a 37°C con filtro de 340 nm
- Cronómetro
- Incubadora de agua o baño seco

Medidas de seguridad y salud ocupacional

Ver Anexo 1.

UNIDAD 12. ANÁLISIS BIOQUÍMICO DE LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

PRÁCTICA 34 LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

DURACIÓN: 1 HORA

Objetivo

- Conocer la fundamentación del estudio del LCR para realizar los exámenes citológicos, citoquímicos, inmunológicos, bacteriológicos, entre otros.

Generalidades

El LCR ejerce un efecto protector, tanto en el cerebro como en la médula espinal. Entre sus funciones principales se encuentra mantener a la masa encefálica en suspensión para disminuir su peso, en adultos, el peso del cerebro desciende de 1 400 g en el aire a 50 g suspendido; de esta forma amortigua los efectos de un traumatismo craneal sobre el cerebro.

A través del LCR, el sistema nervioso se nutre de elementos importantes que le llegan al mismo a través de los vasos sanguíneos y, al pasar la barrera hemoencefálica, forman parte del LCR. Antibióticos, quimioterápicos y otros medicamentos también llegan a las células nerviosas a través del propio LCR. Además de nutrirlo, también es el principal lugar de desecho de elementos; así el LCR también sirve de vehículo de sustancias de eliminación celular.

El análisis de LCR deberá efectuarse para comprobar la integridad del sistema nervioso central, sobre todo en procesos infecciosos. Esta prueba es de suma importancia para la detección y el diagnóstico de meningitis, encefalitis, sífilis del SNC, tumor de la columna vertebral o esclerosis múltiple. También se utiliza para el diagnóstico diferencial entre infarto cerebral y hemorragia intracranial o ineficiencia del tratamiento de estas enfermedades.

Obtención

La obtención del LCR es generalmente a través de punción lumbar entre la 3a. y la 4a. vértebra o entre la 4a. y la 5a. en niños. Generalmente se coloca al paciente en posición sentada, se le desinfecta la piel con tintura de yodo y, previa anestesia local con novocaína al 1 %, se practica la punción. La punción debe realizarse con un estilete, a fin de evitar la implantación de piel que puede causar la formación de quistes dermoides en la columna. La aguja debe llevar un manómetro y una válvula de tres pasos, de forma que pueda medirse con precisión la presión inicial. La recolección del líquido se hace en tres tubos de ensayo esterilizados. En uno de los tubos conviene colocar una pequeña cantidad de oxalato de potasio, para prevenir una eventual coagulación. Las porciones recogidas en cada tubo son de 3 a 4 ml. Al final se procede nuevamente a medir la presión y se retira la aguja, tomando todas las precauciones para evitar la infección del paciente. Se deja descansar sobre la espalda un tiempo y se recomienda luego un reposo prolongado para evitar inconvenientes.

Si la primera porción aparece algo coloreada puede deberse a una acción traumática y, en este caso, los líquidos recogidos en la segunda y tercera porción ya no son hemáticos. Si en los tres aparece coloreado puede deberse a una patología como derrame.

Examen físico

Este consta de tres determinaciones: aspecto, color y presión.

a) Aspecto

Normalmente límpido, cristalino, transparente, como agua de roca. Puede ser también claro en los procesos crónicos y en los agudos en los que no está demasiado aumentado el contenido celular: poliomiелitis, encefalitis, meningitis –linfocitarias benignas – y muchos casos de meningitis tuberculosa o sífilica. Patológicamente se enturbia en las meningitis purulentas de cualquier etiología. En este caso es francamente turbio. En las poliomiелitis graves y en la fase de comienzo o de declinación de las meningitis purulentas, el líquido cefalorraquídeo es solo ligeramente turbio. En la meningitis tuberculosa habitualmente es claro y transparente, pero a menudo es esmerilado, opalescente y tras su extracción (3 horas) puede dar lugar a un fino retículo fibrinoso en tela de araña llamado red de Mya. Cuando esto ocurre conviene retirar la red con un asa de platino e investigar la presencia de *Mycobacterium tuberculosis*. Esto mismo ocurre también, menos frecuentemente, en la lúes nerviosa y en los tumores del sistema nervioso.

b) Color

El líquido cefalorraquídeo es totalmente incoloro. Debe verse igual que el agua destilada, visto sobre un fondo blanco. La coloración anormal se adquiere por la presencia de sangre y sus derivados y puede ser de dos tipos: 1) hemorrágico y 2) xantocrómico.

1) Hemorrágico

El color hemorrágico es rojizo neto y puede ser debido a una hemorragia traumática producida por la extracción o por hemorragias del interior del sistema nervioso como fracturas óseas, hemorragias cerebrales, hemorragias medulares o meníngeas. Para diferenciar basta observar los tres tubos con LCR. Si la hemorragia es traumática, la coloración desaparecerá en el segundo o en el tercer tubo; en cambio, si es patológica, en los tres tubos será de igual intensidad. La centrifugación de un líquido hemático permite reconocer la antigüedad de la hemorragia: las hemorragias recientes o artefactos dejan sin teñir el líquido centrifugado.

La punción directa de un vaso no recoge líquido y se reconoce por la coagulación inmediata de la sangre pura.

2) Xantocrómico

El color xantocrómico se da cuando el LCR presenta un color amarillento; ocurre por la presencia de oxihemoglobina, metahemoglobina o bilirrubina. Aparece en los procesos hemorrágicos después de algún tiempo, también se presenta en las ictericias y en el llamado síndrome de Froin, el cual se produce por obstrucción del canal medular por la presencia de tumores en las últimas vértebras lumbares. En este caso, aparte de la xantocromía, habrá coagulación espontánea de la muestra, poco después de su recogida.

Presión

En un adulto la presión normal es de 80 a 150 mm de agua estando acostado; si está sentado es aproximadamente de 100 a 200 mm de agua. Aumenta fisiológicamente por el llanto, la tos, sonarse la nariz, la defecación o cualquier esfuerzo.

Examen químico

Consta principalmente de tres determinaciones: 1) glucosa, 2) proteínas y 3) cloruros.

1) Glucosa (glucorraquia)

En adultos los valores normales van de 50 a 80 mg/dL. En niños las cifras son ligeramente superiores y están comprendidas entre 70 y 90 mg/dl. Hay una leve diferencia de concentración entre el líquido obtenido por punción lumbar y el extraído de ventrículos o cisterna, pues este es algo más concentrado en glucosa. No debe perderse de vista que la concentración de glucosa en LCR guarda estrecha relación con la glucemia, de modo que es conveniente determinarla simultáneamente de la glucorraquia y compararlas. Una glucorraquia de 60 puede ser anormal si

existe una hiperglucemia más o menos alta. Aumenta en el prematuro y en las meningitis bacterianas o fúngicas, pero no en las víricas. Presenta incremento siempre que existe hipogluorraquia. Esta disminuido en el LCR de la enfermedad de Huntington.

2) Proteínas (albunorraquia o proteinorraquia)

Normalmente en el líquido obtenido por punción lumbar hay entre 15 y 40 mg/dl. El líquido obtenido por punción cisternal contiene cifras menores (entre 10 y 25 mg/dl) y el líquido ventricular mínimas (entre 5 y 15 mg/dl). De ellas, tan solo 1/5 es globulina. No debe olvidarse que la presencia de sangre en LCR (xantocromía) inmediatamente da lugar a una gran elevación de la cifra de proteínas.

3) Cloruros

La concentración normal de cloruros en LCR es de entre 710 y 750 mg/dl. Esta concentración se encuentra como valor superior al de la sangre, expresado como cloruro de sodio. El aumento de esta concentración no tiene mucho interés clínico; se presenta en casos de insuficiencia renal o de deshidrataciones puras (no en patologías del SNC). Tiene más importancia la disminución de la concentración, ya que esta es muy característica en la meningitis tuberculosa (llegando a cifras inferiores a 500 mg/dl) y piógena.

Materiales

Material biológico

LCR

Metodología

Se utilizarán las técnicas descritas con anterioridad en otras prácticas como glucosa, proteínas, cloruros.

Resultado

Examen físico:

Aspecto:

Color:

Glucosa:

Proteínas:

CKBB:

Cloruros:

Medidas de seguridad y salud ocupacional

Ver Anexo 1.

UNIDAD 13. ANÁLISIS DE LÍQUIDO SEMINAL, ESPERMATOBIOSCOPÍA DIRECTA

PRÁCTICA 35 ESPERMATOBIOSCOPÍA DIRECTA

DURACIÓN: 90 MINUTOS

Objetivo

- Realizar el examen del líquido seminal para conocer las alteraciones más relevantes y que pudieran estar relacionadas con problemas de infertilidad.

Generalidades

El semen es una solución compuesta, formada por elementos celulares que son los espermatozoides provenientes de los testículos; abarca aproximadamente 5% del volumen total y una parte líquida, denominada plasma seminal, donde los espermatozoides están suspendidos. La función del plasma seminal es proporcionar nutrientes y vehiculización a los espermatozoides hacia el conducto endocervical, donde termina su contribución al proceso de fertilización.

Durante la eyaculación, el semen no es secretado en forma homogénea, sino en secuencia rápida de tres fracciones:

- La primera fracción se produce en las glándulas bulbouretrales (Cowper). Esta fracción es la más pequeña y corresponde más o menos de 10 a 15% del volumen total del semen. Esta tiene un pH alcalino de aproximadamente 8.4,

su función podría ser lavar y lubricar la uretra para preparar la salida de otras fracciones.

- La segunda fracción es la prostática, la cual constituye aproximadamente 20% del volumen total; contiene la mayor parte de los espermatozoides. Es un líquido de aspecto lechoso y un pH ligeramente ácido (6.5), ya que contiene gran cantidad de ácido cítrico, además de contener gran cantidad de enzimas proteolíticas, coagulantes y fosfatasa ácida.
- La tercera fracción proviene de las vesículas seminales y constituye aproximadamente 60% del volumen total del semen; con él sale la última parte de los espermatozoides. Es un líquido viscoso o gelatinoso, de pH neutro o ligeramente alcalino, de color amarillo. Esta secreción tiene un elevado contenido en fructosa, principal elemento nutritivo de los espermatozoides. Además, contiene potasio, ácido cítrico y una sustancia parecida al fibrinógeno, responsable de la coagulación del líquido seminal.

La espermatobioscopía directa es el estudio más importante para evaluar la fertilidad masculina; consiste en la evaluación macroscópica y microscópica del semen. El semen está formado por una mezcla de espermatozoides suspendidos en un líquido llamado plasma seminal.

El análisis macroscópico incluye la evaluación de:

a) Licuefacción

La muestra se licua completamente a 37°C dentro de los primeros 60 minutos después de la eyaculación. Cuando la licuefacción es incompleta se observan hilos de moco o coágulos gelatinosos. Esto debe ser reportado debido a que se dificulta el conteo espermático.

b) Aspecto

El aspecto se refiere al color que presenta el eyaculado. Una muestra normal es de color gris o blanco opalescente o ligeramente amarillenta. Por las patologías puede presentar un aspecto diferente, puede presentar un color transparente

cuando la concentración de espermatozoides es baja y marrón cuando tiene glóbulos rojos.

c) Volumen

Para medir el volumen, el semen es transferido a tubos cónicos de 15 ml. Las jeringas plásticas y las agujas de inyección no deben ser utilizadas, ya que alteran la movilidad. El volumen normal es de 2.1 a 5.2 ml con un promedio de 3.5 ml. Al aumento se le denomina hiperespermia y a la disminución hipospermia, indicando estados patológicos.

d) Viscosidad

Para determinar la viscosidad se aspira la muestra con la pipeta de transferencia permitiendo la libre caída de gotas, en las que se observa la longitud del filamento y se clasifica como:

1. Normal: gotas pequeñas, bien definidas, goteando libremente con cierta consistencia.
2. Disminuida: cuando gotea libremente con consistencia de agua.
3. Aumentada: no forma gota, presenta filancia (filamento mayor a 2 cm).
4. pH.

El pH se determina impregnando una gota de semen, previamente homogenizada en la escala, en la tira reactiva de pH; posteriormente se compara el color obtenido de la tira con la escala del contenedor del papel indicador. El pH de una muestra normal debe caer en el rango de 7.2 a 8.0.

ANÁLISIS DE LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA

Preparación de la alícuota

El semen se homogeniza con pipeteos continuos suaves, posteriormente se toma una alícuota de 10 µl y se coloca en un portaobjetos de 25x75 mm, utilizando un

cubreobjetos de 22x22 mm. Esto permite tener un espesor de aproximadamente 20 μm y permite la expresión completa del movimiento rotatorio de los espermatozoides. El peso del cubreobjetos distribuye la muestra para una visión óptima y se debe permitir la estabilización de la misma durante un minuto. La preparación se observa al microscopio en un objeto de 40x.

Procedimiento

Para evaluar la movilidad se emplea un objetivo de 40x; se contabiliza la movilidad de 200 espermatozoides en diferentes campos elegidos al azar. Se deben leer campos centrales de la muestra en dirección a las manecillas del reloj. La movilidad se clasifica en porcentaje de acuerdo con las siguientes categorías:

- Motilidad progresiva rápida
- Motilidad progresiva lenta
- Motilidad no progresiva
- Inmóviles

Interpretación y reporte de resultados

La movilidad total es expresada en porcentaje, de la siguiente forma:

- $MT = A+B+C$
- MT = Movilidad Total
- A = Categoría A
- B = Categoría B
- C = Categoría C

La categoría D corresponde a los espermatozoides inmóviles.

Ejemplo:

Conteo total de 233 espermatozoides.

- $A = 35/233 * 100 = 15\%$

- $B = 42/233 * 100 = 18\%$
- $C = 59/233 * 100 = 25\%$
- $D = 97/233 * 100 = 42\%$

Aglutinación

La aglutinación consiste en la unión: cabeza-cabeza, cola-cola, cabeza-cola, pieza intermedia-cola de dos o más espermatozoides.

Análisis de la vitalidad espermática

Procedimiento

1. Se homogeniza la muestra de semen con una pipeta de transferencia.
2. Se coloca en un portaobjetos 10 μL del colorante (eosina).
3. Se añade 10 μL de semen.
4. Se mezcla con un hisopo de madera.
5. Se cubre con un cubreobjetos de 24x40 mm.
6. Se deja pasar un minuto para que se estabilice la muestra.
7. Se valoran 200 espermatozoides con diferentes campos centrales en dirección a las manecillas de reloj, elegidos aleatoriamente con un aumento de 40x.

Se clasifican como:

- Espermatozoides vivos (no teñidos).
- Espermatozoides muertos (teñidos).

Interpretación y reporte de resultados

Se obtiene el porcentaje de espermatozoides vivos (espermatozoides no teñidos), tomando el total de espermatozoides contados.

Ejemplo:

Espermatozoides contados = 235

Vivos = $165/235 \times 100 = 70\%$ (representan la vitalidad)

Muertos = $70/235 \times 100 = 30\%$

Nota: El porcentaje de vitalidad debe ser mayor o igual al porcentaje de Movilidad Total, cuando sucede lo contrario se deben verificar ambas mediciones.

Evaluación de la morfología espermática

Aunque la mejor tinción es del Papanicolaou, también resultan satisfactorias la de hematoxilina, Giemsa, Fucsina básica y la de cristal violeta, deberán clasificarse un mínimo de 200 espermatozoides.

Procedimiento

Se debe utilizar un objetivo de inmersión de 100x de campo claro y un ocular de al menos 10x. La evaluación morfológica debe llevarse a cabo en el campo central del cubreobjetos. Se deben contar al menos 200 espermatozoides consecutivos. Se utiliza un contador de células de laboratorio que posea varias teclas. Una tecla para espermatozoides normales, una para defectos de cabeza, una para defectos del cuello y pieza media y una para defecto de cola. Un espermatozoide con un único defecto, por ejemplo un defecto de cabeza, es anotado apretando la única tecla correspondiente. Sin embargo, si un espermatozoide tiene defectos de cabeza y de pieza media, se presionan las dos teclas simultáneamente. Si un espermatozoide tiene un defecto de la cabeza, pieza media y flagelo se presionan las tres teclas correspondientes en forma simultánea, de esta forma se contabilizan tres defectos en un solo espermatozoide.

Interpretación de resultados

La morfología se valora en 200 espermatozoides en diferentes campos elegidos al azar y se clasifican en cuatro grupos, de acuerdo con los siguientes criterios de morfología espermática:

- Normales
- Defecto de cabeza (macrocefálicos, microcefálicos, bicefálicos, aguzada (alargada), redondeada y amorfa)
- Defecto de pieza intermedia
- Defecto de flagelo (cola doble, cola enrollada, cola corta, gota terminal en la cola, cola en forma de U, cola seccionada, forma unida, etcétera)

Ejemplo:

- Número de espermatozoides contados = 200
- Número de espermatozoides normales = 78
- Porcentaje de espermatozoides normales = 39%
- Número de espermatozoides con defectos = 122 (61 %)
- Número de espermatozoides con defecto de cabeza = 110 (55 %)
- Número de espermatozoides con defecto de pieza media = 18 (9 %)
- Número de espermatozoides con defectos de flagelo = 16 (8 %)

Espermatozoides normales = 39%

Defectos de cabeza = 55%

Defectos de pieza media = 9%

Defecto de flagelo = 8%

Intervalos de referencia para espermatozoides normales

O.M.S. 2 EDICIÓN	O.M.S. 3 EDICIÓN	O.M.S. 4 EDICIÓN (ESTRICTO)
>50%	> 30%	> 15%

Valores fuera de los límites de referencia: teratozoospermia o teratospermia (aumento de espermatozoides anormales en el semen del hombre).

Análisis de la concentración espermática (recuento de espermatozoides)

Preparación de la disolución

Para el conteo espermático se recomienda el uso del hematocrito. Primeramente se evalúa una muestra de semen de 10 μL previamente homogenizada en el microscopio con el objetivo de 40x. Se realiza un conteo en cuenta gruesa y se obtiene la media de tres campos. Con base en el número de espermatozoides encontrados por campo, se realiza la dilución (tabla 1). Las diluciones se realizan empleando una cantidad de semen y una de diluyente para inmovilizar a los espermatozoides dentro de un tubo cónico. La dilución se homogeniza perfectamente con una pipeta de transferencia y se toman 10 μL de la dilución, la cual se coloca en cada una de las cámaras del hemocitómetro. Se deja reposar por tres minutos en un ambiente húmedo hasta que se estabilice la muestra.

Tabla 1. Diluciones de semen para el conteo de concentración en el hemocitómetro

Número de espermatozoides contados por el campo objetivo de 40x	Dilución (semen + diluyente)	Semen (μL)	Diluyente (μL)
<15	1:5 (1+4)	100	400
15-40	1:10 (1+9)	50	450
40-200	1:20 (1+19)	50	950
>200	1:50 (1+49)	50	2450

Conteo en el hemocitómetro (Cámara de Neubauer)

El hemocitómetro tiene dos lados iguales que constan de una retícula que contiene cinco cuadros principales (A, B, C, D, E). El cuadro central está dividido en 25 cuadros más pequeños (E1, E2, E3... E25). A su vez, cada uno de estos últimos

cuadros se divide en 16 cuadros. El cuadro principal tiene 5 mm de longitud, 1 mm de ancho y 0.1 mm de profundidad. El volumen total del cuadro principal es de 10 mm. El conteo se realiza con base en lo siguiente:

1. El cuadro central de la rejilla del hemocitómetro de Neubauer mejorado contiene 25 cuadros grandes, cada uno de los cuales contienen 16 cuadros más pequeños.
2. Para las muestras que contienen menos de 10 espermatozoides se deben contar los 25 cuadros; para las que contienen de 10-40 espermatozoides se deben contar 10 cuadros y para las que contienen más de 40 espermatozoides por cuadro se deben contar cinco cuadros (tabla 2).

Tabla 2. Relación de espermatozoides contados en el cuadro superior izquierdo con respecto al número de cuadros a contar

Número de espermatozoides encontrados en el cuadro superior izquierdo	Número de cuadros evaluados del cuadro central del hemocitómetro
<10 Espermatozoides	25 cuadros
10-40 Espermatozoides	10 cuadros
>40 Espermatozoides	5 cuadros

NOTA: No se deben contar cabezas, colas sueltas ni aglutinados.

Si un espermatozoide está en la línea que divide a dos cuadros adyacentes, solo se debe contar si está en el lado superior e izquierdo del cuadro que se estudia.

3. Interpretación y reporte de resultados. La concentración espermática se expresa en millones/mL. Para obtener este resultado se utiliza la media de los conteos de las dos cámaras del hemocitómetro y se divide entre el factor de conversión correspondiente. El resultado final se expresa en millones de espermatozoides/mL de semen.

Tabla 3. Factores de conversión

Dilución utilizada (semen + diluyente)	Número de cuadros grandes contados		
	25 cuadros	10 cuadros	5 cuadros
1:5 (1+5)	20	8	4
1:10 (1+9)	10	4	2
1:20 (1+19)	5	2	1
1:50 (1+49)	2	0.8	0.4

Para obtener la cuenta total del espermatozoide se realiza lo siguiente:

Cuenta total = volumen del eyaculado x concentración espermática.

Ejemplo:

- Promedio del conteo de tres campos microscópicos con el objetivo de 40x (lo que se hace en el portaobjetos) = 60 espermatozoides.
- Dilución utilizada = 1:20 (1+19).
- Conteo en el cuadro superior del hemocitómetro = 26 espermatozoides.
- Número de cuadros contados = 10 cuadros.
- Promedio del conteo de espermatozoides en ambas cámaras del hemocitómetro = 286 espermatozoides.
- Uso del factor de conversión correspondiente = $286/2$.
- Resultado final del número de espermatozoides expresado en millones sobre mililitro de semen = 143 millones/mL.

Otros tipos celulares presentes en el semen: leucocitos, eritrocitos, células epiteliales, células inmaduras, bacterias, entre otros.

Examen químico

Pueden realizarse diversas pruebas, pero las más importantes son dos: 1) determinación de fructosa y 2) determinación de fosfatasa ácida.

Materiales

Material biológico

Líquido seminal

Equipo de laboratorio

- Microscopios
- Cámaras de Neubauer
- Contador mecánico de células
- Pipetas automáticas
- Puntillas para pipetas automáticas
- Tiras reactivas
- Portaobjetos de 25x75 mm
- Cubreobjetos de 22x22 mm
- Eosina
- Hisopos de madera
- Pipetas de transferencia
- Tubo cónico graduado
- Solución de Macomber y Saunders

Medidas de seguridad y salud ocupacional

Ver Anexo 1.

APÉNDICE A.

CUESTIONARIOS DE PRÁCTICAS

CUESTIONARIO 1

Unidad 1 y 2

- Describa de la forma más sencilla un espectrofotómetro, así como sus diferentes rangos de luz.
- Defina el método colorimétrico.
- ¿En qué consiste la Ley de Beer? Realice un esquema.
- Defina el método cinético.
- ¿Qué es una reacción directa?
- ¿Qué es una reacción indirecta?
- ¿Qué es un método químico?
- ¿Qué es un método enzimático?
- ¿Qué es un complejo cromógeno y en qué tipo de método se forma?
- ¿En qué consiste, por qué y cómo se realiza la desproteínización?
- ¿Qué es una solución problema?
- ¿Qué es una solución patrón o testigo?
- ¿Qué es una solución estándar?
- ¿Qué es un blanco de reactivo?
- ¿Qué es un blanco de suero?
- ¿Qué es el reactivo de color?
- ¿Cuándo se usa agua en lugar de un blanco de reactivos?
- En los métodos cinéticos, además de agua, ¿qué elementos se utilizan para calibrar?

- ¿Qué entendemos por extinción en bioquímica?
- ¿Qué son los valores de referencia?
- ¿Qué tipos de interferencias existen en los métodos calorimétricos?
- ¿Qué tipos de interferencias existen en los métodos cinéticos?
- ¿Qué es estabilidad, linealidad y especificidad en bioquímica?
- Defina que es coenzima y cuál es su función en una reacción química.
- ¿Qué características debe tener un método para utilizarlo en la medición de un analito?
- ¿Cómo puede evitarse el error aleatorio en el laboratorio?
- ¿Cómo debe ser el pipeteo en la realización de las prácticas y por qué?
- ¿Cuáles son las interferencias químicas más frecuentes?
- ¿Cómo se abaten estas interferencias?
- ¿Cuál es la meta fundamental en un laboratorio de análisis clínicos?
- ¿Cuál es la meta en un sistema de control de calidad?
- ¿Cuáles son las fuentes de error en la etapa preanalítica?
- Comente acerca de las variables biológicas y las físicas de los individuos y cómo pueden eliminarse estos posibles errores en el laboratorio.
- ¿Cuáles son los errores más comunes durante la toma de muestra?
- ¿Cuáles son los errores más comunes después de la toma de muestra?
- ¿Qué se persigue en la etapa preanalítica y cómo se logra?
- De las tres etapas de control de calidad, ¿cuál exige mayor cuidado debido a sus riesgos y su frecuencia?
- ¿Qué analitos se elevan por la hemólisis?
- ¿Por qué al tomar muestras de sangre con varios tubos existe un orden exacto y estricto y cuál es?
- ¿Qué tipo de tubos se utilizan en bioquímica clínica?
- ¿Cuáles son las mejores venas para la punción sanguínea?
- ¿Cuáles son las causales para el rechazo de una muestra sanguínea?

CUESTIONARIO 2

Práctica: Glucosa

- ¿Qué es la glucosa?
- ¿Cuál es el propósito de determinar glucosa en el laboratorio?
- ¿Cuál es la especificidad del método y por qué?
- ¿Cuál es la estabilidad del método y por qué?
- Desde el punto de vista bioquímico, ¿cuál es la fundamentación de la tolerancia oral a la glucosa?
- ¿Para qué sirve fundamentalmente la prueba de glucosa posprandial y cómo debe realizarse?
- De acuerdo con la OMS, ¿cómo debe realizarse una prueba de tolerancia oral a la glucosa?
- ¿Cuál es el umbral renal de glucosa y qué significa?
- ¿Cuáles son los valores de referencia actual para la tolerancia oral a la glucosa y la glucosa posprandial, así como para la hemoglobina glicosilada?
- ¿Cuál es la relación de la tolerancia oral a la glucosa y la resistencia a la insulina?
- ¿Cuál es la relación de la tolerancia oral a la glucosa, la concentración de insulina y el síndrome metabólico?
- ¿Cuál es el objetivo de realizar un bypass gástrico en un paciente diabético?

CUESTIONARIO 3

Práctica: Compuestos nitrogenados no proteicos

- ¿Qué es un compuesto nitrogenado no proteico?
- Para realizar la determinación de urea, creatinina y ácido úrico en una muestra de suero turbia, ¿es posible desproteinizar sin alteraciones en el resultado en virtud de que se trata de compuestos nitrogenados?

- Mencione qué tienen en común los compuestos nitrogenados no proteicos.
- ¿De dónde provienen la urea, la creatinina y el ácido úrico?
- ¿La urea, la creatinina y el ácido úrico se elevan en las enfermedades renales? Refiera sí o no y por qué.
- Fundamento del método de la uricasa con reacción química
- ¿Cuál es la importancia de la medición de creatinina?
- ¿Evaluar la función renal o la función del músculo?
- Fundamento del método de Jaffe con reacción química
- ¿Es el amonio una determinación útil para medir falla renal o falla hepática?, ¿por qué?
- Fundamento del método de la ureasa con reacción química
- ¿Cuál es la diferencia entre BUN (Nitrógeno Ureico en Sangre) y urea? ¿Cómo se obtiene uno a partir del otro?
- ¿Describa la enfermedad de Reye, la miastenia gravis, la eclampsia, síndrome de Fanconi, hipotiroidismo, gota y glomerulonefritis?

CUESTIONARIO 4

Práctica: Proteínas

- ¿Cómo se definen las proteínas plasmáticas?
- ¿Cómo se llaman los métodos para proteínas plasmáticas y albúmina y qué tipo de métodos son?
- ¿Qué reacción se lleva a cabo en el método para proteínas totales y qué tipo de compuesto químico se forma?
- ¿Qué reacción se realiza para determinar albúmina y cuáles son las condiciones de la prueba?
- ¿Cómo se calcula el valor de globulinas totales?
- ¿Qué indica el índice A/G?
- Escriba los valores de referencia para proteínas plasmáticas totales, albúmina, globulinas y relación A/G.

- ¿Cuál es el valor diagnóstico de la determinación de proteínas totales y albúmina?
- ¿Cuándo se solicita una electroforesis de proteínas plasmáticas?
- ¿Qué información se obtiene de una inmunoelectroforesis y de qué forma se puede sustituir su estudio?

CUESTIONARIO 5

Práctica: EGO

- Defina Examen General de Orina.
- ¿Cuántas partes componen el Examen General de Orina y cómo se llaman?
- ¿Cómo se realiza correctamente la recolección de orina?
- ¿Cuál es la forma correcta de usar la tira para orina?

CUESTIONARIO 6

Práctica: Depuración de creatinina

- Defina índice de filtración glomerular.
- ¿Para qué sirve la prueba de depuración de creatinina?
- ¿Para qué sirve la prueba de la cistatina C?
- ¿Para qué fue diseñada la fórmula de C-G propuesta en la práctica?
- ¿Cuáles son los errores más comunes en la depuración de creatinina?
- Aunque existen muchos tipos de depuración (urea, glucosa, etc.), ¿por qué la depuración de creatinina se considera la mejor?

CUESTIONARIO 7

Práctica: Pruebas de funcionamiento hepático

- ¿Cuál es la diferencia entre bilirrubina total y bilirrubina directa?
- ¿Qué significan las siglas DMSO y cuál es la diferencia con la cetrimida?
- ¿Qué mide la ictericia hepática, la ictericia prehepática y la ictericia pos-hepática?
- De cada una de las pruebas funcionales hepáticas realice tablas o diagramas con los siguientes elementos:
 - Nombre el método y escriba la reacción (si el método no tiene nombre no lo indique). Escriba que tipo de método es y cuál es su especificidad y estabilidad.
 - Indique qué función del hígado evalúa.
 - Indique en qué patologías sale elevada la prueba.
 - Indique en qué patologías sale disminuida la prueba. (Si no se tienen datos de todas en estos últimos dos aspectos, solo anote lo que conozca).

CUESTIONARIO 8

Práctica: Perfil pancreático

- ¿Cuál es el principal trastorno que se produce por la falla en la función endócrina del páncreas?
- ¿Qué padecimientos se producen por la falla en la función exocrina del páncreas?
- Defina pancreatitis aguda y pancreatitis crónica.
- Defina metaloenzima.
- ¿Cuál es el comportamiento de las enzimas amilasa y lipasa en la pancreatitis aguda?

- De acuerdo con la guía del IMSS, ¿cuál es la enzima más específica para el diagnóstico de la pancreatitis aguda y por qué?
- ¿La composición del reactivo es congruente con el fundamento de la práctica? Sí o no y por qué.
- ¿Qué determinaciones de laboratorio se solicitan al momento de ingresar al hospital por una probable pancreatitis aguda?
- Clasifique las determinaciones de laboratorio según se trate: pruebas diagnósticas y pruebas predictivas. ¿Cuál es la diferencia entre ellas?
- Según la guía del IMSS, las pruebas de laboratorio son las únicas útiles para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la pancreatitis aguda. Conteste ampliamente.

CUESTIONARIO 9

Práctica: Perfil cardíaco

- Según el cuadro 3 de la guía del IMSS y la práctica proporcionada, ¿cuáles son los mejores marcadores para el infarto agudo al miocardio en sus fases tempranas y fase tardía?
- Según la guía del IMSS, ¿cuál es el mejor marcador para el infarto al miocardio? Correlacione con la información de la práctica.
- ¿Qué es una isoforma o isoenzima? Describa las isoenzimas de la CK y la LDH
- ¿Considera que el perfil enzimático cardíaco ha sido desplazado por las proteínas contráctiles?
- Realice una gráfica para la CK-MB y otra para las troponinas cardíacas que simulen su comportamiento durante la enfermedad, según lo que se estipula en la guía del IMSS.

CUESTIONARIO 10

Práctica: Líquido seminal

- ¿Qué es el semen?
- ¿Cuántas y cuáles son las fracciones que componen el líquido seminal? ¿Cuál es su función y cómo están formadas?
- ¿Qué pruebas se realizan en el análisis microscópico y cuáles los valores de referencia?
- ¿Qué pruebas se determinan en el análisis macroscópico y cuáles son los valores de referencia?
- Dibuje las anomalías de los espermatozoides e indique qué porcentaje se acepta como normal en un varón fértil.
- ¿Qué es infertilidad y qué es esterilidad?
- ¿Cuándo se solicita un estudio del semen?

CUESTIONARIO 11

Práctica: LCR

- Describa un LCR normal.
- Describa las partes que conforman el estudio bioquímico del líquido cefalorraquídeo.
- Anote los valores de referencia del manual y compárelos con los del artículo si este los menciona.
- Realice una tabla donde mencione los parámetros bioquímicos que se evalúan y anote ahí el valor de referencia. En las dos columnas siguientes anote qué indica valores menores y mayores a este valor normal.
- ¿Cuál es la importancia del estudio del LCR en hematología, en patología y en microbiología?

REFERENCIAS

- Aguilar Salinas, C. A. et al. (2020). *Nutrición y endocrinología: actualidades para la práctica clínica*. Permanyer, CDMX, 138 p.
- Ameijeras, Hermida et al. (2007). Lipasa y Amilasa total y sus isoenzimas como marcadores de daño pancreático en pacientes tratados con fármacos antiepilépticos. *Farmacia Hospitalaria*, vol. 31, núm. 5, pp. 303-306.
- Ángel, Gilberto y Ángel, Mauricio (2006). *Interpretación Clínica del laboratorio*. Editorial Médica Panamericana, Bogotá, 732 p.
- Araque Marín, Pedronel (2022). *Fundamentos de Bioquímica para Medicina*. Fondo Editorial EIA, Antioquía.
- Baranski, Thomas J., McGil, Janet B, Silverstein, Julie M. (edits). (2020) *Manual Washington de especialidades clínicas: endocrinología*. Wolters Kluwer, Barcelona, 426 p.
- Baynes, J. W. y Dominiczak, M. H. (2024). *Bioquímica médica*. Elsevier, Barcelona, 719 p.
- Bernard Henry, John (2010). *El laboratorio en el Diagnóstico Clínico*. Editorial Marbán, México, 1 360 p.
- Bishop, M. L. (2001). *Química Clínica. Principios, procedimientos y correlaciones*. Mc Graw Hill, Biblao, 760 p.
- Blanco, I. y Fernández, F. (2001) Alpha-1-antitrypsin Pi phenotypes S and Z in Spain: an analysis of the published surveys. *Respir Med*, vol. 95, núm. 2, pp. 109-114.
- Botella Romero, F. y Alfaro Martínez, J. (2008). Repercusiones nutricionales y manejo de la pancreatitis crónica. *Nutr. Hosp.*, vol. 23, pp. 59-63.
- Bourges Rodríguez, Héctor (2003). Las dislipoproteinemias. *Cuadernos de Nutrición*, vol. 2, mayo-junio. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.
- Brown, T. A. (2002). *Genomes*. BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, UK.
- Bustos B, Raúl et al. (2001). Pseudolitiasis biliar inducida por ceftriaxona. *Revista Chilena de Pediatría*, vol. 72, núm. 1.

- Cataño López, M. Á. (2007). *Bioquímica Clínica: De la Patología al Laboratorio*. Editorial Ergon, CDMX, 616 p.
- Corti, Marcelo et al. (2001). Carga viral en líquido cefalorraquídeo de pacientes hemofílicos HIV-1 positivos bajo tratamiento con HAAART. *Medicina*, vol. 61, Argentina.
- Cowan-Oreilly-Stewart-Shepherd (2001). *Bioquímica Clínica* (texto ilustrado). Editorial Harcourt, Madrid, 163 p.
- Cox, Timothy y Sinclair, John (2004). *Molecular Biology in Medicine*. Blackwell Science, USA.
- D'Ocon, C. et al. (2006). *Fundamentos y Técnicas de Análisis Bioquímico*. Thomson-Paraninfo, España, 440 p.
- De la Llata Romero et al. (2004). Mujer de 43 años de edad con hipertensión arterial, infección de vías respiratorias, astenia, adinamia, hiporexia y tinte icterico. *Gac. Méd. Méx.*, vol. 140, núm. 3.
- Dean, Laura et al. (2004). The Genetic Landscape of Diabetes. *National Library of Medicine (US)*, NCBI, junio.
- Dean, Michael. Bethesda (2002). The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. *National Library of Medicine (US)*, NCBI, noviembre.
- Deska, Kathleen (2010). *Mosby's manual of diagnostic and laboratory test*. Editorial Pagana, Canadá.
- Díaz Hernández, Martha Patricia y Burgos Herrera, Luis Carlos (2002). ¿Cómo se transporta la glucosa a través de la membrana celular? *IATREIA*, vol. 15, núm.3, septiembre.
- Emine Ercikan, Abali et al. (2024). *Bioquímica detrás de los síntomas*. Wolters Kluwer, Barcelona, 435 p.
- Falcón Franco, M. A. (2020) *Texto de Bioquímica*. Libromed, Panamá.
- Fernández Espina, C. y Mazziota, D. (2005). *Gestión de Calidad en El Laboratorio Clínico*. Editorial Panamericana, España.
- Forsbach Sánchez, Gerardo et al. (2003). Impacto del nuevo criterio para el diagnóstico de la diabetes gestacional en la estimación de su prevalencia. *Rev Invest Clin*, vol. 55, núm. 5.
- García Silvera, Edgar Edurman (2024). *Bioquímica*. Instituto Superior Tecnológico Tecnocuatoriano ISTTE, Ecuador.
- Gallardo, Marlén et al. (2003). Relación de la alteración espermática en el líquido seminal con algunos metabolitos del estrés oxidativo. *Rev. Cubana Invest. Biomed.*, vol. 22, núm. 2.

- Gaw, Allan et al. (2000). *Bioquímica Clínica*. Editorial Harcourt, España.
- Gomis de Barbara et al. (2006). *Tratado Sed de Diabetes Mellitus*. Editorial Médica Panamericana, Argentina.
- Guerra, M. et al. (2005). Relación entre la hemoglobina glicosilada, antioxidantes totales y la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidada (GPx) en pacientes son diabetes mellitus tipo 2 controlados y no controlados en Bogotá. *Universitas Scientiarum, Revista de la Facultad de Ciencias*, vol 10.
- Henry John, Bernard (2005). *El Laboratorio en el Diagnóstico Clínico* (Todd-Sanford). Editorial Marbán, México.
- Hernández Valencia, Marcelino y Zárate, Arturo (2007). Esterilidad inexplicable: evaluación médica terapéutica. *Perinatol Reprod. Hum*, vol. 21, núm. 3 Julio- septiembre.
- Huerta Torrijos, Jorge et al. (2001). Análisis sistemático del equilibrio ácido-base en formato automatizado. Principios básicos y propuesta. *Revista de la Asociación Mexicana de Medicina Crítica y Terapia Intensiva*, vol. XV, núm. 3, mayo-junio.
- Hulton, S. A. (2001). Evaluación de los cálculos del tracto urinario en niños. *Arch Dis Child*, vol. 84, pp. 320-323.
- Ibañez, J. I. et al. (2004). Utilidad de la troponina-I, CPK-MB y mioglobina en el diagnóstico del infarto de miocardio y de los procesos de necrosis muscular de origen no cardíaco. Ed. Servicio de Bioquímica Clínica. Hospital Virgen del Camino, Pamplona.
- Jianping Weng, et al. (2002). Sreenin for MODY mutations, GAD antibodies, and type 1 diabetes associated HLA genotypes in women with gestacional diabetes mellitus. *Diabetes Care*, vol. 25, núm. 1, enero.
- Juárez Delgado, Francisco Javier (2001). Cirugía en la obesidad mórbida. *Rev. Fac. Med. UNAM*, vol. 44, núm. 3, mayo-Junio.
- Kably Amble, Alberto et al. (2008). Impacto de las anormalidades de la cabeza del espermatozoide como factor pronóstico en la infertilidad de causa no determinada. *Ginecol Obstret Mex*, vol. 76, núm. 3.
- King Strasinger, Susan y Schaub Di Lorenzo, Marjorie (2010). Análisis de orina y de los líquidos corporales. Ed. Médica Panamericana, Argentina, 432 p.
- Lieberman, Michael y Peet, Alisa (2023). *Bioquímica médica básica: un enfoque clínico*. Wolters Kluwer, Barcelona, 1 122 p.

- León Ramentol, C. C y Fernández Clúa, M. J. (2022) *Gestión de la función calidad en procesos sustantivos encadenados en los laboratorios clínicos docentes*, Editorial Universitaria, Cuba.
- López-Chiñas, A. et al. (2009) Fertilidad y cáncer testicular: relación entre la estirpe histológica y el seminograma. *Rev Mex Urol*, vol. 69, núm. 1, pp. 13-16.
- Madalena, L. B. et al. (2005). A-I en nefropatías: su relación con el status renal y las microproteínas urinarias. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, vol. 39, núm. 3, junio-septiembre, Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires, Argentina, pp. 279-283.
- Mata Cases, Manel (2005). *Diabetes Mellitus tipo 2: Protocolo de Actuación*. Ed. Grupo de Estudio de la Diabetes en Atención Primaria de Salud (GEDAPS) de la Societat Catalana de Medicina Familiar i Comunitària. España.
- Medina Escobedo, Martha et al. (2005). Cristaluria por oxalato de calcio y ácido úrico, su relación con el Ph, calciuria y uricosuria. *Bioquímica*, vol. 30, núm. 2.
- Méndez Rosa, Máxima (2022). *Manual de prácticas de laboratorio de Bioquímica*. Universidad Abierta para Adultos (UAPA), República Dominicana, 66 p.
- Mérida de la Torre, F. J. y Moreno Campoy, E. E. (2015). *Manual para técnico superior de laboratorio clínico y biomédico*. Ed. Médica Panamericana, Argentina.
- Merriman, Tony (2004). Entender las causas genéticas de la diabetes. *Diabetes Voice*, vol. 49, núm. 1, marzo.
- Mújica, M. L. (2002). Aprendizaje basado en problemas. *Rev. Fac. Med.*, vol. 45, núm. 6, noviembre-diciembre, UNAM.
- Mundt, L. A. y Shanahan, K. (2011). *Graff. Análisis de orina y de los líquidos corporales*. Editorial Médica Panamericana, Argentina.
- Muñoz Calvo, M. T. (2007). Síndrome Metabólico. *Pediatr. Integral*, vol. XI, núm. 7, pp. 615-622.
- Nicoll, D., McPhee, S. y Pignone, M. (2004). *Manual de pruebas diagnósticas*. El Manual Moderno, México, 569 p.
- Organización Mundial de la Salud (2001). *Manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical*. Editorial Médica Panamericana, Argentina. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/101594>.

- Posada Ayala, María (2020). *Gestión de muestras biológicas*. Paraninfo, Madrid, 286 p.
- Prescripción Médica. *El periódico de los médicos*. Año 33, núm. 390, mayo 2010, México DF.
- Prieto Valtueña, J. M. y Yuste, J. R. (2011). *Balcells, la clínica y el laboratorio: Interpretación de análisis y pruebas funcionales. Exploración de los síndromes. Cuadro biológico de las enfermedades*. Editorial Elsevier, Barcelona, España.
- Ramírez Hernández, F., Hernández Revilla, M. y Guzmán Sánchez, J. (2005). Cambios electrolíticos y ácido-base en el paciente sometido a nefrectomía para donación renal. *Anestesiología*, vol. 28, núm. 3.
- Reina Bouver, B., Vicenta Paparella, C. y Nestor Feldman, R. (2007). Efecto del tabaquismo sobre la espermatogénesis en hombres con infertilidad idiopática. *Archivos Españoles de Urología*, vol. 60, núm. 3, pp. 273-277.
- Revilla Monsalve, M. C. (2005). *Reproducción Humana*. Centro Médico Nacional de México-SEP, México.
- Rodríguez, S. et al. (2007). Prolactina y Cáncer de Próstata. *Revista Médica*, vol. 7, núm. 2, pp. 26-31. UV, Xalapa, Ver.
- Rodríguez Zapata, M. et al. (2000). Protocolo de Indicaciones e interpretación clínica de la inmunoelectroforesis de las inmunoglobulinas en la práctica clínica. *Medicine*, vol. 8, núm. 25.
- Ruiz Reyes, G. y Ruiz Argüelles, A. (2010). *Fundamentos de interpretación clínica de los exámenes de laboratorio*. Ed. Médica Panamericana, Argentina, 400 p.
- Sánchez Lozada, R. et al. (2005). Pancreatitis aguda: experiencia de cinco años en el Hospital General de México. *Gac. Méd. Méx.*, vol. 141, núm. 2, pp. 123-127.
- Sánchez Pozo, Antonio y González de Buitrago Díaz, Jesús (2002). *Bioquímica Clínica*. McGraw Hill Interamericana, España.
- Simes, Luis Emilio (2020). *Introducción a la bioquímica: interpretación de análisis clínicos*. Jorge Sarmiento Editor-Universitas, España.
- Sociedad Española de Bioquímica Clínica (2000). *El Laboratorio Clínico del Siglo XXI*. <http://www.seqc.es/sigloxxi/doc.html>
- Soriano Llorca, T., Moy del Barrio, G. y Pinar Manzanet J. M. (2005). Síndrome RS3PE. *Caso clínico*, vol. 77, septiembre.

- Stickel, S. et al. (2008). Hepatotoxicidad grave después de la ingestión de suplementos nutricionales de Herbalife contaminado con *Bacillus subtilis*. *Journal of Hepatology*, vol. 50, núm. 1, pp. 111- 117.
- Trujillo Arriaga, Héctor Miguel (2007). La curva de tolerancia a la glucosa oral. Un enfoque alternativo. *ContactoS*, vol. 6, pp. 6-24.
- Vargas Carrillo, Miguel A. et al. (2003). Síndrome de ovarios poliquísticos: abordaje diagnóstico y terapéutico. *Rev Biomed*, vol. 14, núm. 3, julio-septiembre.
- Wilson, M. D. (2002.) *Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades infecciosas*. Editorial El Manual Moderno, México.
- Yucra, S., Gasco, M., Rubio, J. y González, G. F. (2008). Exposición ocupacional a plomo y pesticidas organofosforados. Efecto sobre la salud reproductiva masculina. *Rev. Peru Med. Exp. y Salud Pública*, vol. 25, núm. 4.
- Zárate, Arturo et al., Basurto Acevedo, Lourdes y Saucedo García, Rennata (2001). La obesidad: conceptos actuales sobre fisiopatogenia y tratamiento. *Rev Fac Med*, vol. 44, núm. 2, marzo- abril, UNAM, México.

REFERENCIAS DE INTERNET

- Academy Clinical Laboratory. <http://www.aclps.org/>
- American Association for Clinical Chemistry <http://www.aacc.org/Pages/default.aspx>
- Biblioteca virtual de salud en Cuba. <http://bvscuba.sld.cu/>
- Clinical Chemistry. <http://www.clinchem.org/>
- Imbiomed. Catálogo de revistas. <http://www.imbiomed.com.mx/1/1/catalogo.html>
- Internet Public Library. <http://www.ipl.org/>

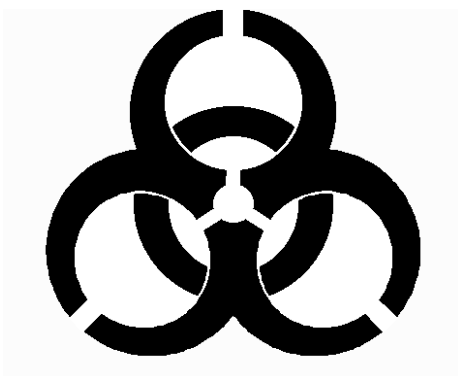
ANEXOS

ANEXO 1. APÉNDICE NORMATIVO

PLAN DE MANEJO DE RESIDUOS PELIGROSOS

1. Introducción

De acuerdo con el Plan General de Desarrollo 2030 de la Universidad Veracruzana, es necesaria una universidad socialmente responsable, comprometida con la cultura de la sustentabilidad y donde impere un compromiso con el cuidado del medio ambiente. Acorde con ello, la Facultad de QFB cuenta con un Plan de Manejo de Residuos Peligrosos como herramienta para definir los procedimientos técnicos y administrativos necesarios para el manejo de los residuos peligrosos generados en cada uno de los laboratorios de la Facultad de QFB.



Símbolo universal de riesgo biológico

DESCRIPCIÓN DEL PROGRAMA

2. Objetivo

Establecer los procedimientos técnicos y administrativos necesarios dentro de la Facultad de QFB para el manejo integral de los residuos peligrosos de acuerdo con la normatividad vigente, a fin de prevenir el daño al medio ambiente y a la salud humana de acuerdo con el compromiso como “universidad social y ambientalmente responsable”.

3. Meta

La meta es que la disposición de los residuos peligrosos dentro de la Facultad de QFB se realice de acuerdo con este Plan de Manejo de Residuos Peligrosos, dando como resultado el cumplimiento de la normativa vigente y el control sobre los impactos ambientales significativos.

4. Alcance

Este plan es aplicable a todos los laboratorios y áreas de trabajo de la Facultad de QFB, desde los estudiantes hasta el personal académico, administrativo, técnico y manual correspondiente que intervenga en las áreas de trabajo involucradas.

5. Marco jurídico del manejo de residuos químicos peligrosos

El sistema jurídico mexicano está constituido por disposiciones constitucionales, leyes generales y federales, reglamentos y normas oficiales mexicanas. Todo lo descrito en el presente Plan estará en estricto apego a las políticas institucionales y a la Normatividad Oficial Mexicana en materia de Residuos Peligrosos. A continuación, se enlistan las leyes y normas aplicables.

6. Normatividad aplicable a los residuos químicos peligrosos

Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente.

Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos.

Reglamento de la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos.

Reglamento de la Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente en Materia de Residuos Peligrosos.

Reglamento de la Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente en Materia de Evaluación del Impacto Ambiental.

Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005. Establece las características, el proceso de identificación, la clasificación y los residuos peligrosos.

Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT--1993. Establece el procedimiento para la prueba de extracción para determinar los constituyentes que hacen un residuo peligroso por su toxicidad al ambiente.

Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT--1993. Establece el procedimiento para determinar la incompatibilidad entre dos o más residuos considerados como peligrosos por la NOM-052-SEMARNAT-- 1993.

Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002 Protección ambiental, salud ambiental y residuos peligrosos biológico-infecciosos. Clasificación y especificaciones de Manejo.

7. Otra normatividad relacionada

Secretaría del Trabajo y Previsión Social

Reglamento Federal de Seguridad, Higiene y Medio Ambiente de Trabajo (DOF 21 de Enero de 1997). Establece las medidas necesarias para la prevención de accidentes y enfermedades de trabajo.

NOM-005-STPS-1993. Relativa a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el almacenamiento, transporte y manejo de sustancias inflamables y combustibles.

NOM-118-STPS-2000. Establece el sistema para la identificación y comunicación de peligros y riesgos por sustancias químicas peligrosas en los centros de trabajo.

NOM-002-SCT2-94. Listado de las sustancias y materiales peligrosos más usualmente transportados.

NOM-007-SCT2-1994. Marcado de envases y embalajes destinados al transporte de sustancias y residuos peligrosos.

NOM-010-SCT-1994. Disposiciones de compatibilidad y segregación, para el almacenamiento y transporte de sustancias, materiales y residuos peligrosos.

8. Conceptos básicos

¿Qué es un residuo?

Un residuo es todo material o producto que se desecha y que se encuentra en estado sólido, semisólido, líquido o gaseoso, contenido en recipientes o contenedores; es decir, cualquier material que ya no sea útil a la persona que lo empleaba, producto de reacciones y/o como resultado de las prácticas de laboratorio; incluye cualquier insumo o materia prima caducada o que haya perdido las características por las cuales fue adquirido. Dicho residuo puede ser susceptible de ser valorizado o sujetarse a tratamiento o disposición final, conforme a lo dispuesto en la LGPGIR y demás ordenamientos que de ella deriven. Se pueden clasificar en:

- Biológico-infecciosos
- Químicos peligrosos

¿Qué es un residuo químico peligroso?

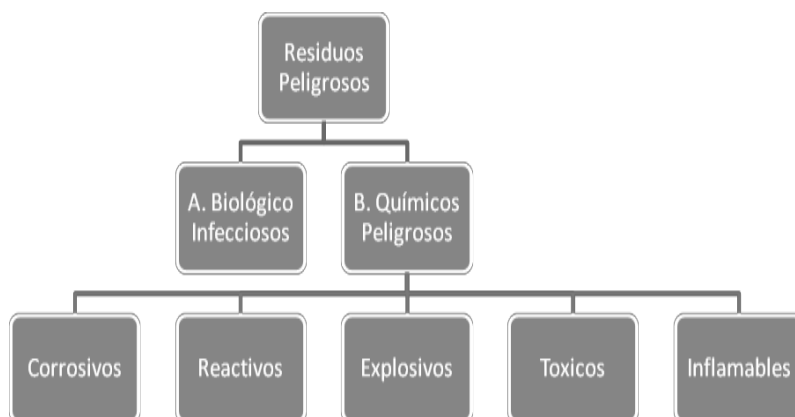
Es aquella sustancia química que posea alguna de las características de corrosividad (C), reactividad (R), explosividad (E), toxicidad (T) e inflamabilidad (I), o que contengan agentes que le confieran peligrosidad; así como envases, recipientes, embalajes y suelos que hayan sido contaminados cuando se transfieran a otro sitio, de conformidad con lo que se establece en la LGPGIR.

¿Qué implicaciones tienen las propiedades de los residuos?

Su forma de manejo depende de cada propiedad y demanda conocer las precauciones a seguir, los envases a emplear y el tipo de almacenamiento que se requiere.

¿Qué es un residuo biológico-infeccioso?

Es cualquier material que contenga agentes biológico-infecciosos, es decir, con cualquier microorganismo capaz de producir enfermedades cuando está presente en concentraciones suficientes, en un ambiente propicio, en un hospedero susceptible, en presencia de una vía de entrada y que puedan causar efectos nocivos a la salud y al ambiente.



Reactivo

Una muestra en estado líquido o sólido, después de ponerse en contacto con el aire, se inflama en un tiempo menor a cinco minutos, sin que exista una fuente externa de ignición. Cuando se pone en contacto con agua reacciona espontáneamente y genera gases inflamables en una cantidad mayor a 1 L/kg del residuo por hora. Posee en su constitución cianuros o sulfuros liberables, cuando se expone a condiciones ácidas.



Explosivo

Cuando una muestra representativa tiene una constante de explosividad, mayor o igual al nitrobenzeno. Es capaz de producir una reacción o descomposición detonante o explosiva a 25°C y a 1.03 kg/cm² de presión.

Tóxico

Cuando la muestra representativa se somete a la prueba de extracción para toxicidad conforme a la NOM-053-SEMARNAT- 1993, el lixiviado contiene cualquiera de los constituyentes listados en las tablas 5, 6 y 7, en concentraciones mayores a los límites señalados en dichas tablas. Por ejemplo: arsénico 5.0 mg/L, níquel 5.0 mg/L, mercurio 0.2 mg/L, plata 5.0 mg/L, cloroformo 6.0 mg/L, fenol 14.4 mg/L.

Inflamable

Cuando una solución acuosa contiene más de 24% de alcohol en volumen. Cuando es un líquido y tiene un punto de inflamación inferior a 60°C. Cuando no es líquido, pero es capaz de provocar fuego por fricción, absorción de humedad o cambios químicos espontáneos (a 25°C y a 1.03 kg/cm²). O bien, se trata de gases comprimidos inflamables o agentes oxidantes que estimulan la combustión.

9. Identificación de residuos peligrosos

La identificación de residuos peligrosos de tipo químico se realizará teniendo en cuenta que una sustancia ha perdido sus características intrínsecas, sus propieda-

des han dejado de ser útiles para el usuario, se encuentran fuera de especificaciones o han caducado, así como las sustancias químicas que han perdido, carecen o presentan variación en sus características intrínsecas para ser utilizadas, transformadas respecto a los estándares de diseño o producción originales, por lo que se deben manejar como residuos con “características peligrosas”. Un residuo es considerado peligroso (de acuerdo con la normatividad vigente), cuando independientemente de su estado físico presenta una o más de las características de peligrosidad tales como corrosividad, explosividad, toxicidad e inflamabilidad. Es importante reconocer la diferencia entre un residuo y una sustancia, con la finalidad de que, en las segundas, sean aprovechadas al máximo sus propiedades químicas originales y no se desechen cuando estas aún no han sido agotadas, ya que no serían consideradas como residuos. Una sustancia tóxica es aquella que puede producir en organismos vivos, lesiones, enfermedades, implicaciones genéticas o muerte. Un residuo es cualquier material generado en los procesos de extracción, beneficio, transformación, producción, consumo, utilización, control o tratamiento cuya calidad no permita usarlo nuevamente en el proceso que lo generó.

PELIGRO						
CONTIENE UN RESIDUO PELIGROSO						
Nombre del Residuo:						
Características del Residuo:	C Corrosivo	R Reactivo	E Explosivo	T Tóxico	I Inflamable	B Biológico-Infeccioso
Estado físico:	S Sólido		L Líquido		G Gaseoso	
ESTE RESIDUO DEBERÁ SOMETERSE A TRATAMIENTO LEYES FEDERALES PROHIBEN SU DISPOSICIÓN INADECUADA						
Si usted localiza este contenedor almacenado o desechado de manera inapropiada, de manera que represente un riesgo a la salud o el medio ambiente, por favor repórtelo a las siguientes instancias						
Nombre del generador Facultad de Química Farmacéutica Biológica - Xalapa Universidad Veracruzana Dirección: Circuito Gonzalo Aguirre Beltrán s/n, Zona Universitaria, Xalapa de Enríquez, Veracruz. CP 91000 Teléfono: 01 228 842 1759			Nombre de la empresa responsable de su traslado y/o tratamiento y/o disposición final ECOENTRONO S.A. DE C.V. Dirección: Carretera Las Trancas-Coatepec No. 14, Col. Rafael Gulizar y Valencia, Xalapa de Enríquez, Veracruz. CP 91637 Teléfonos: 01 (228) 813-7262 y 813-7241			
Fecha de generación			Fecha de entrega para su traslado			

Etiqueta de identificación de residuos dentro de la Facultad de QFB.

10. Clasificación de residuos peligrosos

Químicos

Para poder saber si los residuos que se generan en cualquier actividad son o no peligrosos existe un procedimiento, el cual se detalla a continuación:

1. Un residuo es peligroso si está listado en el artículo 31 de la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR), la cual define los siguientes:
 - Aceites lubricantes usados.
 - Disolventes orgánicos usados.
 - Convertidores catalíticos.
 - Sustancias o mezcla de sustancias con metales pesados como plomo.
 - Baterías a base de mercurio o de níquel-cadmio.
 - Lámparas fluorescentes y de vapor de mercurio.
 - Aditamentos que contengan mercurio, cadmio o plomo.
 - Fármacos.
 - Plaguicidas y sus envases, que contengan remanentes de los mismos.
 - Compuestos orgánicos persistentes como los bifenilos policlorados.
 - Lodos de perforación base aceite, provenientes de la extracción de combustibles fósiles, y lodos provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales cuando sean considerados como peligrosos.
2. Si el residuo no se clasifica como peligroso en el artículo 31 de la LGPGIR, se debe consultar en los cinco listados de la Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, que establece las características, el procedimiento de identificación, la clasificación y los listados de los residuos peligrosos (residuos químicos peligrosos por fuente específica o no específica, residuos peligrosos resultado del desecho de productos químicos fuera de especificaciones o caducos (tóxicos, agudos y crónicos) y residuos sujetos a condiciones particulares de manejo; o bien se puede determinar su peligrosidad mediante el análisis CRETl, que se realiza a fin de identificar si el residuo presenta cualquiera de las siguientes características: corrosividad, reactividad,

explosividad, toxicidad ambiental o inflamabilidad. Es importante mencionar que la identificación de las características de explosividad es mediante revisión bibliográfica.

3. Los listados dentro de la Facultad de QFB deberán elaborarse de la siguiente forma:

- Sustancias ácidas
- Sustancias básicas
- Sustancias inorgánicas sólidas
- Sustancias inorgánicas líquidas
- Sustancias orgánicas sólidas
- Sustancias orgánicas líquidas
- Solventes
- Plaguicidas
- Metales pesados

Biológico-infecciosos

Para efectos de la NOM 087 se consideran residuos peligrosos biológico-infecciosos los siguientes:

- La sangre y los componentes de esta, solo en su forma líquida, así como los derivados no comerciales, incluyendo las células progenitoras, hematopoyéticas y las fracciones celulares o acelulares de la sangre resultante (hemoderivados).
- Los cultivos y las cepas de agentes biológico-infecciosos.
- Los cultivos generados en los procedimientos de diagnóstico e investigación, así como los generados en la producción y control de agentes biológico-infecciosos.
- Utensilios desechables usados para contener, transferir, inocular y mezclar cultivos de agentes biológico-infecciosos.
- Tejidos, órganos y partes que se extirpan o remueven durante las necropsias, la cirugía o algún otro tipo de intervención quirúrgica que no se encuentren en formol.

- Las muestras biológicas para análisis químico, microbiológico, citológico e histológico, excluyendo orina y excremento.
- Los cadáveres y partes de animales que fueron inoculados con agentes enteropatógenos en centro de investigación y bioterios.
- Los residuos no anatómicos.

Son residuos no anatómicos los siguientes:

- Los recipientes desechables que contengan sangre líquida.
- Los materiales de curación, empapados, saturados o goteando sangre o cualquiera de los siguientes fluidos corporales: líquido sinovial, líquido pericárdico, líquido pleural, líquido céfalo-raquídeo o líquido peritoneal.
- Los materiales desechables que contengan esputo, secreciones pulmonares y cualquier material usado para contener estos, de pacientes con sospecha o diagnóstico de tuberculosis o de otra enfermedad infecciosa según sea determinado por la SSA mediante memorándum interno o publicado en el *Boletín Epidemiológico*.
- Los materiales desechables que estén empapados, saturados o goteando sangre, o secreciones de pacientes con sospecha o diagnóstico de fiebres hemorrágicas, así como otras enfermedades infecciosas emergentes según sea determinado por la SSA mediante memorándum interno o a través del *Boletín Epidemiológico*.
- Materiales absorbentes utilizados en las jaulas de animales que hayan sido expuestos a agentes enteropatógenos.
- Los objetos punzocortantes.
- Los que han estado en contacto con humanos o animales o sus muestras biológicas durante el diagnóstico y el tratamiento, únicamente: tubos capilares, navajas, lancetas, agujas de jeringas desechables, agujas hipodérmicas, de sutura, de acupuntura y para tatuaje, bisturís y estilotes de catéter, excepto todo material de vidrio roto utilizado en el laboratorio, el cual deberá desinfectar o esterilizar antes de ser dispuesto como residuo municipal.

Tabla 1. Disposición de residuos peligrosos biológico-infecciosos

Tipo de residuos	Estado físico	Envasado	Color
Sangre	Líquidos	Recipientes herméticos	Rojo
Cultivos y cepas de agentes infecciosos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Rojo
Patológicos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Amarillo
	Líquidos	Bolsas de polietileno	Amarillo
Residuos no anatómicos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Rojo
	Líquidos	Recipientes herméticos	Rojo
Objetos punzocortantes	Sólidos	Recipientes rígidos polipropileno	Rojo

En las áreas de generación se deberán separar y envasar todos los residuos peligrosos biológico-infecciosos, de acuerdo con sus características físicas y biológico-infecciosas, conforme a la tabla. Durante el envasado, estos residuos no deberán mezclarse con ningún otro tipo de residuos municipales o peligrosos.

1. Las bolsas deberán ser de polietileno de color rojo traslúcido de calibre mínimo 200 y de color amarillo traslúcido de calibre mínimo 300, impermeables y con un contenido de metales pesados de no más de una parte por millón y libres de cloro, además deberán estar marcadas con el símbolo universal de riesgo biológico y la leyenda “Residuos peligrosos biológico-infecciosos”.
2. Las bolsas se llenarán a 80% de su capacidad, cerrándose antes de ser transportadas al sitio de almacenamiento temporal y no podrán ser abiertas o vaciadas.
3. Los recipientes de los residuos peligrosos punzocortantes deberán ser rígidos, de polipropileno color rojo, con un contenido de metales pesados de no más de una parte por millón y libres de cloro, que permitan verificar el volumen ocupado en el mismo, resistentes a fracturas y pérdidas de contenido al caerse, destructibles por métodos físicos, tener separador de agujas y abertura para depósito, con tapa(s) de ensamble seguro y cierre perma-

nente, deberán contar con la leyenda que indique “Residuos peligrosos punzocortantes biológico-infecciosos” y marcados con el símbolo universal de riesgo biológico.

4. Los recipientes de los residuos peligrosos líquidos deben ser rígidos, con tapa hermética de polipropileno color rojo o amarillo, con un contenido de metales pesados de no más de una parte por millón y libres de cloro, resistente a fracturas y pérdidas de contenido al caerse, destructible por métodos físicos, deberá contar con la leyenda que indique “Residuos peligrosos líquidos biológico-infecciosos” y marcados con el símbolo universal de riesgo biológico.

Almacenamiento RPBI

- Se deberá destinar un área en la facultad para el almacenamiento temporal de los residuos peligrosos biológico-infecciosos. Estos residuos envasados deberán almacenarse en contenedores metálicos o de plástico con tapa y ser rotulados con el símbolo universal de riesgo biológico, con la leyenda “Residuos peligrosos biológico-infecciosos”.
- Los residuos patológicos, humanos o de animales (que no estén en formol) deberán conservarse a una temperatura no mayor de 4°C, en las áreas de patología o en almacenes temporales con sistemas de refrigeración o en refrigeradores en áreas que designe el responsable del establecimiento generador dentro del mismo.

11. Medición

La siguiente tabla describe la cuantificación, frecuencia de recolección y confinamiento de los RPBI generados por el laboratorio.

Unidades de medición	La medición se realizará de acuerdo con el estado del residuo; es decir, si es sólido será en gramos y kilogramos; si es líquido será en mililitros y litros.
-----------------------------	---

Frecuencia	Los residuos se recolectarán al final de cada práctica de laboratorio, se almacenarán temporalmente en el área destinada para ello y posteriormente se procederá al trámite de su retiro de manera semestral en el caso de los residuos químicos, para el caso de los residuos RPBI el retiro se efectuará semanalmente.
Confinamiento	Específico para cada laboratorio y área de refrigeración de la Facultad de QFB.

12. Recolección y transporte interno

La recolección y el transporte interno de los residuos químicos peligrosos, así como de los residuos peligrosos biológico-infecciosos, hacia el área de almacenamiento temporal, se encuentra a cargo de los técnicos académicos de la Facultad de QFB de cada uno de los laboratorios y se realiza al término de cada práctica de laboratorio. Para la recolección se deben utilizar los contenedores y las etiquetas de recolección específicos para este tipo de residuos, que cumplan con las características de seguridad y que sean confiables para el desarrollo de los trabajos de recolección y transporte interno hacia el área de almacenamiento.

El personal a cargo de la recolección interna de residuos peligrosos químicos deberá tener conocimiento de las características de los residuos que maneja, de tal forma que responda adecuadamente durante una contingencia o un posible accidente de derrame con este tipo de residuos. Asimismo, deberá de reportar el incidente de forma inmediata al área generadora, así como a quien corresponda, con la finalidad de establecer un plan de contingencia. Debe portar equipo de seguridad consistente, al menos, de overol o bata, guantes adecuados al tipo de residuo manejado, zapatos cerrados y lentes de protección. Si se recolectan gases, deberá utilizar la mascarilla con filtro de aire. Se deberá evitar recolectar al mismo tiempo residuos que sean incompatibles entre sí, para prevenir accidentes.

Los residuos sólidos peligrosos serán almacenados en el Sitio de Almacenamiento Temporal de Residuos Peligrosos que deberá cumplir con las exigencias

mínimas, por un periodo no mayor a seis meses, en condiciones seguras y con la segregación necesaria para garantizar condiciones de seguridad. Estas exigencias mínimas implican: *a)* no verter residuos en lugares no autorizados o no especificados para ese tipo de residuo, *b)* desechar los residuos en forma diferenciada y debidamente identificados y *c)* uso obligatorio de los elementos de protección personal.

Condiciones básicas para las áreas de almacenamiento

El sitio de almacenamiento temporal de residuos peligrosos tendrá las siguientes características:

1. Estar separadas de las áreas de producción, servicios, oficinas y de almacenamiento de materias primas o productos terminados.
2. Estar ubicadas en zonas donde se reduzcan los riesgos por eventuales emisiones, fugas, incendios, explosiones e inundaciones.
3. Contar con dispositivos para contener posibles derrames, tales como muros, pretilas de contención o fosas de retención para la captación de los residuos en estado líquido o de los lixiviados.
4. Cuando se almacenan residuos líquidos, se deberá contar en sus pisos con pendientes y, en su caso, con trincheras o canaletas que conduzcan los derrames a las fosas de retención con capacidad para contener una quinta parte, como mínimo, de los residuos almacenados o del volumen del recipiente de mayor tamaño.
5. Contar con pasillos que permitan el tránsito de equipos mecánicos, eléctricos o manuales, así como el movimiento de grupos de seguridad y bomberos, en casos de emergencia.
6. Contar con sistemas de extinción de incendios y equipos de seguridad para atención de emergencias, acordes con el tipo y la cantidad de los residuos peligrosos almacenados.
7. Contar con señalamientos y letreros alusivos a la peligrosidad de los residuos peligrosos almacenados, en lugares y formas visibles.

8. El almacenamiento debe realizarse en recipientes identificados, considerando las características de peligrosidad de los residuos, así como su incompatibilidad, previniendo fugas, derrames, emisiones, explosiones e incendios.
9. La altura máxima de las estibas será de tres tambores en forma vertical.

Condiciones básicas para el almacenamiento en áreas cerradas

Para el almacenamiento en espacios cerrados, el lugar deberá reunir las características siguientes:

1. No deben existir conexiones con drenajes en el piso, válvulas de drenaje, juntas de expansión, albañales o cualquier otro tipo de apertura que pudieran permitir que los líquidos fluyan fuera del área protegida.
2. Las paredes deben estar construidas con materiales no inflamables.
3. Contar con ventilación natural o forzada. En los casos de ventilación forzada, debe tener una capacidad de recepción de por lo menos seis cambios de aire por hora.
4. Los espacios deben estar cubiertos y protegidos de la intemperie y, en su caso, contar con ventilación suficiente para evitar acumulación de vapores peligrosos y con iluminación a prueba de explosión.
5. No rebasar la capacidad instalada del almacén.

Condiciones básicas para el almacenamiento en áreas abiertas

Los sitios aptos para almacenamiento en sitios abiertos deberán cumplir con las siguientes condiciones:

1. Las áreas deben estar localizadas en sitios cuya altura sea, como mínimo, el resultado de aplicar un factor de seguridad de 1.5 m, al nivel de agua alcanzado durante la mayor tormenta registrada en la zona.
2. Los pisos deben ser lisos y de material impermeable en la zona donde se guarden los residuos, y de material antiderrapante en los pasillos. Estos deben ser resistentes a los residuos peligrosos almacenados.

3. En el caso de áreas abiertas no techadas, no deberán almacenarse residuos peligrosos a granel, cuando estos produzcan lixiviados.
4. En los casos de áreas no techadas, los residuos peligrosos deben estar cubiertos con algún material impermeable para evitar su dispersión por viento.

Por parte de microgeneradores

Las condiciones para el almacenamiento de residuos peligrosos realizado por microgeneradores deben cumplir con lo siguiente:

1. En recipientes identificados considerando las características de peligrosidad de los residuos, así como su incompatibilidad, previniendo fugas, derrames, emisiones, explosiones e incendios.
2. En lugares que eviten la transferencia de contaminantes al ambiente y garantice la seguridad de las personas de manera que se prevengan fugas o derrames que puedan contaminar el suelo.

13. Recolección y transporte externo

Los residuos serán entregados a la empresa de recolección y transporte externo, especializadas para realizar estas actividades y que deben estar autorizadas por la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), por la Secretaría de Comunicaciones y Transportes (SCT), así como por las autoridades universitarias correspondientes. La entrega de los residuos peligrosos provenientes del generador, se acompañará por el manifiesto de recibo, transporte y recepción, mismo que será firmado por la empresa especializada como establecimiento generador de residuos peligrosos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente

Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos

Reglamento de la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos

Reglamento de la Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente en Materia de Residuos Peligrosos

Reglamento de la Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente en Materia de Evaluación del Impacto Ambiental

NOM-052-SEMARNAT-2005

NOM-053-SEMARNAT-1993

NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental, Salud ambiental, Residuos peligrosos biológico-infecciosos, Clasificación y especificaciones de manejo

Reglamento Federal de Seguridad, Higiene y Medio Ambiente de Trabajo

NOM-005-STPS-1993

NOM-118-STPS-2000

NOM-002-SCT2-1994

NOM-007-SCT2-1994

NOM-010-SCT-1994

ANEXO 2

PRÁCTICA COMPLEMENTARIA. FLEBOTOMÍA

DURACIÓN: 30 MINUTOS

Se presenta la práctica de flebotomía como complemento al conocimiento adquirido en experiencias educativas previas, pues aunque no forma parte del Programa de Laboratorio de Bioquímica Clínica, que se concentra en el diagnóstico, el control del tratamiento, la prevención y la investigación de los procesos patológicos a nivel celular, la flebotomía es parte de las habilidades prácticas básicas.

Objetivos

- Definir y realizar los procedimientos necesarios para minimizar los errores en la toma de muestras.
- Definir y aplicar adecuadamente el procedimiento para la punción venosa.
- Validar la enorme importancia de obtener una muestra apropiadamente colectada, su correcto envasado y transporte.
- Realizar la punción venosa entre los alumnos y utilizar el modelo brazo mecánico para manejo de material utilizado en la punción.

Generalidades

La flebotomía constituye una de las etapas más importantes en el trabajo del laboratorio clínico. Por una parte, representa el primer contacto entre el laboratorio y sus pacientes, por lo que es muy importante que la muestra sea colectada de

manera apropiada. La seguridad de su origen y el correcto envasado y transporte constituyen factores fundamentales en la evaluación y el informe de los exámenes a realizar. El organismo utiliza la sangre para el transporte de oxígeno, alimento, residuos y otros materiales que hay en el interior del cuerpo, así como para regular la temperatura corporal, los líquidos y el equilibrio ácido básico. Debido a las múltiples funciones de la sangre dentro del cuerpo, los exámenes de esta o de sus componentes pueden suministrar indicios clave para el diagnóstico de muchas condiciones médicas. La sangre está compuesta por una porción líquida (plasma) y por una porción celular. El plasma contiene varias sustancias que están disueltas en el líquido. El suero es lo que queda cuando el fibrinógeno se ha separado del plasma (líquido que queda después de que se deja coagular la sangre en un tubo de ensayo). La porción celular de la sangre consta principalmente de glóbulos rojos, pero también contiene glóbulos blancos y plaquetas. Los tubos al vacío han reemplazado a las jeringas. Estos tubos pueden estar siliconados para evitar la hemólisis de la muestra; vienen preesterilizados por irradiación y presentan tamaños de 2 a 30 mL. Durante la recolección de la sangre, y hasta que el suero es separado de los glóbulos rojos, debe reducirse la posibilidad de hemólisis (utilizando agujas de calibre adecuado, tubos limpios y secos, un mezclado suave, etc.) ya que la hemólisis produce la elevación *in vitro* de la concentración de los metabolitos del suero, al liberarse estos de los eritrocitos; por ejemplo fósforo, sodio, hemoglobina, proteínas totales, lípidos, enzimas, bilirrubinas, etc. También puede provocar un efecto de dilución de los componentes químicos del suero, al liberarse sustancias del interior de los eritrocitos. Si se toman varias muestras de sangre, con tubo al vacío y una sola punción venosa hay que tener precaución de poner los tubos en un orden definido para evitar la contaminación cruzada entre tubos.

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

- Tubos sin anticoagulante (rojo).
- Tubos para pruebas de coagulación (azul).
- Tubos con otros anticoagulantes (lila, verde, verde-gris y amarillo).

TAREA 1

Investigar cuál es el contenido de los tubos Vacutainer (tipo anticoagulante y otras sustancias) según su color y cuál es su función. Realizarlo en forma de tabla. Actividad para entregar.

Materiales

Para desinfectar la piel:

- Alcohol isopropílico a 70%
- Algodón
- Gasas

Para punción de la vena:

- Ligadura de goma de látex u otra variable comercial (2-5 mm de diámetro por 35-40 cm de largo).
- Tubos al vacío correctamente identificados.
- Soporte para tubos Vacutainer.
- Agujas desechables estériles calibre 20, 19 o 18.
- Recipiente para desechos punzocortantes.
- Bolsas rojas para desechos biológicos.

Condiciones de la toma de muestra de sangre venosa

- Es necesario que la persona que va a tomar la muestra adopte actitud de confianza, autoseguridad y equilibrio. Conocer y realizar los procedimientos necesarios para minimizar los errores en la toma de muestras.
- Se debe explicar brevemente al paciente las maniobras que va a realizar para obtener la mayor colaboración posible. Debe tranquilizarse al paciente para disminuir el estado de estrés.
- Revisar que todo el material esté listo (tubos rotulados, torundas de algodón, alcohol, ligaduras, jeringa, gradilla, tapones).

- El paciente y el operador deben estar en posición confortable y en un sitio con buena iluminación.
- El paciente debe estar sentado en una silla y debe extender el brazo sobre el borde de una mesa, encima de una toalla desechable, para tener acceso fácil y cómodo a la fosa antecubital. Evitar el uso de bancos altos sin respaldo.
- Es necesario tener en cuenta el tipo de análisis, el volumen de la muestra y la edad del paciente.
- Para volúmenes pequeños de muestra es recomendable utilizar el lóbulo de la oreja, pues en caso de utilizar los dedos de la mano se corre el riesgo de infecciones por contaminación en el trabajo de laboratorio. Para un volumen mayor, el sitio más adecuado es la vena que se encuentra en el pliegue anterior de la flexión del codo, se recomienda utilizar la vena mediana basílica o cefálica. En los pacientes obesos las venas que se observan azulosas son demasiado superficiales y pequeñas y es mejor no utilizarlas. Es conveniente que el paciente no mire mientras se está realizando la punción.

Selección del sitio de punción

Venas superficiales del brazo

- Cefálica
- Basílica
- Media basílica
- Mediana cefálica
- Radial accesoria
- Cubital superficial
- Radial superficial

TAREA 2

Dibujar, copiar o imprimir un esquema donde se localicen estas venas. Actividad para entregar.

Métodos

Procedimiento para la punción venosa

Desarrollo de la práctica:

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

Para realizar la venopunción:

- Se penetra la piel con la aguja formando un ángulo de 15° con el brazo y con el bisel hacia arriba, se sigue la dirección de la vena.

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

TAREA 3

Identificar en un esquema las diferentes posturas de los pacientes al realizar la toma de muestra. Actividad para entregar.

Criterios de laboratorio para especímenes inaceptables

Las causas más frecuentes de rechazo de especímenes sanguíneos son:

Identificación inadecuada

Cada laboratorio debe determinar la cantidad mínima de información del paciente que debe ser incluida en la solicitud de laboratorio y en el recipiente de la muestra. Esta información incluye generalmente nombre, dirección, habitación, número de identificación, sexo, edad. El flebotomista debe verificar visual y verbalmente la identidad del paciente, comparando su nombre con el de la pulsera de identificación, la prueba requerida y las etiquetas. El tubo y la solicitud de laboratorio deben volverse a controlar para verificar su identidad luego de ser recibidos. Las diferencias entre el nombre de la solicitud del laboratorio y el envase de la muestra es causa de rechazo de esta.

Volumen de sangre inadecuado recogido en tubos o jeringas con aditivo

La cantidad de aditivo adicionada a un tubo al vacío presupone que este se llenará totalmente con sangre. Si se extrae menos sangre de la requerida, la cantidad excesiva de aditivo tiene el potencial de afectar adversamente la exactitud de los resultados de las pruebas. El EDTA y citrato de sodio para hematología y coagulación son inaceptables con menos de 100% del llenado del tubo. No se han investigado recomendaciones de tolerancia absoluta para otros aditivos. Hasta ahora, el lineamiento solamente puede incidir sobre los posibles efectos perjudiciales de los aditivos en exceso.

Utilización de tubos de recolección inadecuados

En general, el suero es la muestra preferida para la mayoría de los análisis bioquímicos. Los tubos de fluoruro de sodio diseñados para la muestra de glucosa son inapropiados para la mayor parte de los otros procedimientos. Los agentes quelantes son inaceptables para las determinaciones enzimáticas la mayoría de las veces. La heparina es tal vez el anticoagulante que menos afecta los procedimientos de laboratorio, aunque esto depende en gran parte del método.

Hemólisis

La hemólisis puede ser el resultado de una venipuntura difícil o de un manejo impropio del espécimen recolectado. La hemólisis puede resultar de un proceso de la enfermedad que causa la destrucción intravascular de los eritrocitos. La hemólisis visible es inaceptable (mayor a 200 mg/L de hemoglobina) cuando se analizan estas sustancias utilizando ciertos métodos. El grado de interferencia depende del grado de hemólisis, la concentración de la variable analítica y la metodología.

Transporte inapropiado

Las muestras para determinación de ácido láctico, gases en sangre, amonio y otros procedimientos donde existe una significativa susceptibilidad al deterioro, no deben ser analizadas si no son transportadas al laboratorio en hielo y dentro de un tiempo preestablecido.

Tiempo preanalítico permisible

Deben tomarse medidas cuando el tiempo máximo permisible es excedido. La falsificación de los resultados será asumida médicamente. El responsable del laboratorio marcará el resultado obtenido con una nota apropiada o se negará a llevar a cabo la prueba. La última medida es especialmente aconsejable cuando la conclusión médica puede deducirse del resultado, lo cual es una desventaja para el paciente.

VIDEOS GRABADOS EN EL LABORATORIO DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

Diagnóstico de alteraciones en la glucosa sanguínea

https://youtu.be/_a6zrCBZ5o

Valoración de la función renal

<https://youtu.be/e3MG8sEvGtg>

Aplicación diagnóstica de la determinación de proteínas plasmáticas

<https://www.youtube.com/watch?v=g9JioGbI8Dg>

Estudio de los lípidos y dislipoproteinemias

https://youtu.be/sV_FXf9AzpE

Análisis de electrolitos séricos

<https://youtu.be/DXBAbzh3oBE>

Valoración de función renal y vías urinarias

https://youtu.be/_YFiIN3cxkE

Pruebas de función hepática y vías biliares

<https://youtu.be/iNodh5ntgM4>

Perfil pancreático

<https://youtu.be/F3nQQAJtbDk>

Perfil cardíaco

<https://youtu.be/TWXthISgVas>

Examen de líquido cefalorraquídeo

Adultos

https://www.youtube.com/watch?v=m_vQ7PqN9jA

Neonatos

<https://www.youtube.com/watch?v=AflLqB3Fqas>

<https://youtu.be/nwSyqlubBWA>

Examen de líquido seminal

<https://youtu.be/eSUic-ij9wg>

Siendo rector de la Universidad Veracruzana el doctor Martín Gerardo Aguilar Sánchez, MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA de Isaac Zamora Bello, Eduardo Rivadeneira Domínguez y María Azucena Mendoza Fernández se terminó de producir en diciembre de 2025. La edición estuvo al cuidado de Marina Cuéllar Martínez y la maquetación fue realizada por Aída Pozos Villanueva.

La Bioquímica Clínica es fundamental para la práctica de la medicina, debido a que muchas enfermedades tienen una base bioquímica que explica los fenómenos patológicos a nivel celular. La aplicación de los principios de esta ciencia en el análisis de líquidos y tejidos ha servido, desde hace décadas, como una ayuda valiosa para los médicos en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de la evolución de una enfermedad. Por esta razón, es indispensable actualizar los conocimientos que fundamentan la experiencia educativa, la mejora en el proceso enseñanza-aprendizaje y la vinculación teórico-práctica. Este manual de prácticas es un recurso que facilita el aprendizaje teórico-práctico de los estudiantes, sustentado en una revisión bibliográfica actual y apoyada con estructuras químicas, que ayudan a hacer más didáctica la presentación. Este manual busca beneficiar los procesos de la Facultad de Química Farmacéutica Biológica, así como todas aquellas relacionadas con la Bioquímica Clínica, tales como las facultades de Bioanálisis, Medicina, Biología y Nutrición, principalmente.

