

27

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"ZARAGOZA"



UTILIDAD Y FUNCIONAMIENTO DE LAS TIRAS
REACTIVAS EN EL LABORATORIO DE
ANALISIS CLINICOS

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO

BIOLOGO

P R E S E N T A :

MARIA GUADALUPE ARIZAGA PEREZ



1985



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	Páginas
<u>CAPITULO I</u>	
Introducción -----	1
Objetivos -----	2
Hipótesis -----	3
<u>CAPITULO II</u>	
Generalidades -----	4
-Sector de nitritos -----	7
-Sector de pH -----	13
-Sector de proteínas -----	16
-Sector de glucosa -----	19
-Sector de cuerpos cetónicos -----	26
-Sector de urobilinógeno -----	31
-Sector de bilirrubina -----	35
-Sector de sangre -----	39
<u>CAPITULO III</u>	
Material -----	44
Equipo -----	45
Reactivos -----	45
Métodos -----	48
-Sector de nitrito -----	48
1. Determinación de 3-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidrobenzoquinolina -----	48

2. Determinación de la sulfanilamida -----	49
-Sector de pH -----	52
1. Determinación del rojo de metilo -----	53
2. Determinación de azul de bromotimol -----	53
-Sector de proteínas -----	54
1. Determinación del tetraclorofenol -----	54
2. Determinación del pH -----	55
-Sector de glucosa -----	56
1. Determinación de la glucosa oxidasa -----	57
2. Determinación de la peroxidasa -----	58
3. Determinación del pH -----	58
-Sector de cuerpos cetónicos -----	59
1. Determinación de la glicina -----	59
2. Determinación de nitroprusiato de sodio -----	60
3. Determinación del pH -----	61
-Sector de urobilinógeno -----	62
1. Determinación del 4-metoxibenzoldiazonio -----	62
-Sector de bilirrubina -----	64
1. Determinación del 2,6-diclorobenzoldiazonio -----	64
-Sector de sangre -----	66
1. Determinación de tetrametilbencidina -----	66
2. Determinación del 2,5-dihidroperoxihexano -----	67
3. Determinación del pH -----	68

CAPITULO IV

Resultados -----	71
------------------	----

CAPITULO V

Análisis de resultados ----- 77

Conclusiones ----- 78

CAPITULO VI

Bibliografía ----- 81

Apéndice A ----- 84

Apéndice B ----- 90

C A P I T U L O I

I N T R O D U C C I O N .

El exámen de la orina constituye un método de diagnóstico-aplicable, a enfermedades y transtornos atribuibles a riñones, vejiga, uretra, próstata y vesículas seminales, así como a alteraciones del aparato cardiovascular, hematopoyético, digestivo, endocrino y hepático. El exámen de la orina consiste en la lectura de la tira y análisis microscópico del sedimento (15).

En la actualidad el trabajo y los costos de los laboratorios han aumentado enormemente, por lo que es necesario material de bajo costo que permita un análisis rápido de la orina, estas cualidades son proporcionadas por las tiras reactivas, que poseen un sin número de determinaciones que se pueden realizar rápidamente y cuyas ventajas se describen a continuación:

- a) Facilidad de manejo
- b) Pequeña cantidad de muestra
- c) Bajo costo
- d) Tiempo mínimo

Ya que los reactivos que poseen las tiras no son establesindefinitamente, se considera importante conocer la vida media de estas. Este estudio se realiza con la tira reactiva "Combur 8 test" (Lakeaide).

El producto "Combur 8 test" es una tira combinada que se -

usa en los exámenes generales de orina, y que permite en una sola operación, con una única introducción de esta en la orina, - determinar simultáneamente y valorar los siguientes parámetros:

nitritos

pH

proteínas

glucosa

cuerpos cetónicos

urobilinógeno

bilirrubina

sangre

Es importante hacer recalcar que las tiras reactivas nos dan resultados semicuantitativos. Estas poseen una fecha de caducidad, aun cuando el envase original permanezca sin abrir. Desde el fabricante hasta el consumidor, a través de varios intermediarios pueden transcurrir meses y años, por lo cual conviene saber si después de su fecha de caducidad estas tiras pueden proporcionar resultados confiables.

Objetivos:

- 1.- Estudiar los componentes de las tiras reactivas, reacciones, inhibidores, sensibilidad, especificidad y estabilidad de las mismas.
- 2.- Determinar el tiempo de funcionamiento de las tiras reactivas después de vencida la fecha de caducidad, la cual es de 24 meses.

Hipótesis

El sector de cetonas contiene nitroprusiato de sodio, que es sensible a la humedad y se descompone lentamente. El sector de sangre contiene un peróxido que se descompone con el oxígeno, por lo cuál estos dos sectores serán los primeros en perder su aspecto físico y sensibilidad. Los demás reactivos que contienen los otros sectores son más estables por lo cuál darán resultados confiables después de su fecha de caducidad que es de 24 meses.

CAPITULO II

GENERALIDADES

Las tiras reactivas de Lakeaide (Boehringer Mannheim) tienen un soporte o cuerpo de plástico, esta contiene varios cojines de celulosa (áreas o sectores reactivos) fijados con una malla protectora. Cada cojín está impregnado con un emortiguador y uno o varios indicadores químicos (cuando la orine llega al sector reactivo ocurre una reacción química que responde a la presencia de compuestos químicos específicos de la muestra). - También la tira tiene un papel hidrófobo. Fig.No. 1

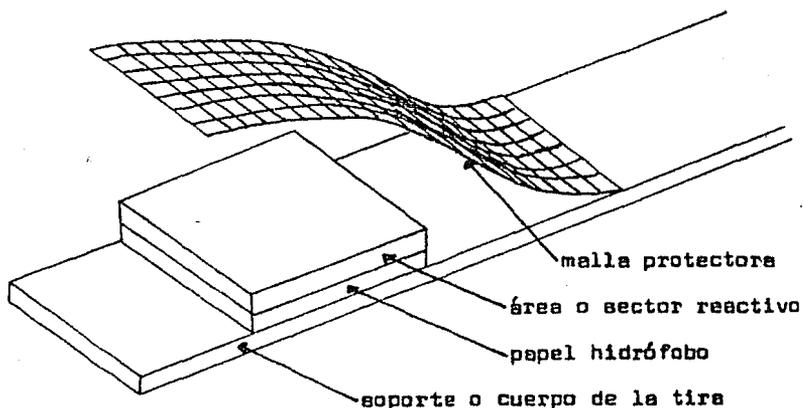


Figura No. 1

Se han realizado estudios para comparar la sensibilidad y precisión de diversas marcas de tiras. Smith y cols. (25) compararon el "N"-Multistix (AMES) y el "Combur 8 test" (B.M.) Encontraron que el "Combur 8" es más sensible a la valoración de la glucosa, sangre y nitritos que el "N"-Multistix y que dá resultados más precisos que el "N"-Multistix en los sectores de pH, proteínas y sangre. Por otra parte Hearne y cols. (12) compararon el Rapignost Total Screen A (Hoechst) y el "N"-Multistix (AMES) encontrando que el Rapignost es más sensible a las proteínas y a la glucosa y menos sensible a las cetonas, bilirrubinas y sangre que el "N"-Multistix. Por lo tanto el "Combur 8" es más sensible a los nitritos y a la sangre que el "N"-Multistix y que el Rapignost, proporcionando buena precisión en la determinación del pH.

Las ventajas del "Combur 8 test" son (25):

- a) Fácil manejo
- b) La lectura del color obtenido es facilitado por la forma vertical de la etiqueta, en lugar de la forma horizontal.
- c) Superior construcción del laminado de la malla con un gran conjón en las zonas de prueba y el fondo opaco.
- d) La hematuria se distingue de la hemoqlobinuria.
- e) Buena precisión para el análisis del pH urinario.

Los factores que influyen en errores son (6,8,25):

- 1.- La regla de variación individual entre técnicos: es de gran importancia para la determinación obtenida de falsos positi

vos y falsas negativos, debido a la percepción del color.

2.- La composición de las diferentes orinas.- Es otro factor importante que está influenciado por el estado nutricional, - procesos metabólicos, capacidad del riñón para manejar se-lectivamente las sustancias y presencia de sustancias de interferencia que tienden a inhibir las reacciones analíticas.

El trabajo consiste en realizar las pruebas funcionales de cada uno de los sectores y determinar los reactivos de cada una de las áreas de 5 lotes diferentes del producto comercial "Com-bur 8 test" (Lakeside).

Lote	Caducidad	Tiempo de Fabricación
83156	1o.-Enero-85	6 meses
82023	1o.-Agosto-84	11 meses
82945	1o.-Febrero-84	17 meses
81819	1o.-Mayo-83	28 meses
81670	1o.-Abril-82	39 meses

Una de las limitaciones es el no especificar la concentra-ción inicial de cada reactivo de los 5 lotes al salir como pro-ducto terminado, esto implica el no poder ver el grado de dete-rioro en los reactivos con el tiempo de almacenamiento. Otra de las limitaciones es que las tiras se humedecen rápidamente al -

exponerlas al aire, perdiendo sus propiedades físicas.

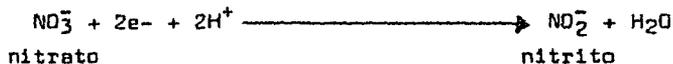
Cabe mencionar la importancia que representa la atención de una muestra representativa de orina ya que de la toma de esta depende la confiabilidad de los resultados. Se utiliza de -- preferencia la primera orina de la mañana. La mayoría de los metabolitos que se van a valorar se representan en cantidades pequeñas en la orina normal.

A continuación se describen los reactivos que se encuentran en cada sector, la reacción que se lleva a cabo con el metabolito a determinar y las alteraciones que pueden ocasionar un valor elevado.

SECTOR DE NITRITOS

El sector es de color blanco y tiene papel hidrófobo.

Los nitritos nos dan un índice de infección bacteriana ya que algunos microorganismos reducen el nitrato en nitrito. La - reducción de este es debido a un sistema de transporte de electrones en donde el último aceptor es el oxígeno y ocurre en condiciones anaeróbicas (9).



Mecanismo de acción y contenido

El sector está constituido de:

- a) Sulfanilamida
- b) 3-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidrobenzoquinolina (THBCH)
- c) Acido tartárico

El mecanismo de la reacción ocurre de la siguiente manera (fig. 2), el nitrito que contiene la orina reacciona con la sulfanilamida en medio ácido formando una sal de diazonio, esta se acopla con el derivado quinolinico en posición "para" dando lugar a un colorante azoico de color rosa (18,25).

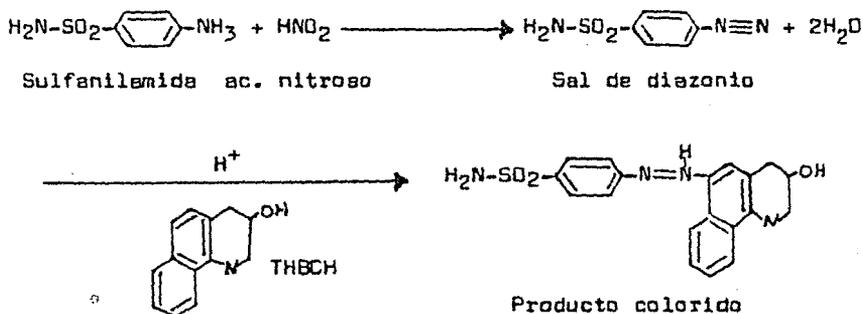


Figura No. 2

Valores de referencia

Los nitritos no se encuentran normalmente presentes en la orina y los que provienen de la alimentación no se eliminan como tales. Como ya se mencionó esta prueba está basada en la habilidad de los microorganismos patógenos para reducir el NO₃ de

rivado de la dieta, a NO₂ (22).

Alteraciones

Las infecciones urinarias pertenecen al grupo de los procesos infecciosos más frecuentes de la patología médica. Su importancia radica en el daño que pueden ocasionar sobre la función renal. Producen una considerable morbilidad (sobre todo en adolescentes) con complicaciones frecuentes en el embarazo, se presentan a cualquier edad; originando a menudo incapacidad severa y muerte (14).

Los microorganismos encontrados en genitales externos y vagina son: Staphylococcus sp.; Streptococcus viridans; Neisserias Streptococcus fecalis; Lactobacilos; Corinebacterias y Coliformes (3,9).

En la siguiente tabla se enuncian los microorganismos más frecuentes en la orina de pacientes con infecciones de vías urinarias (3,4,18).

Las enfermedades en las que se puede encontrar nitrito positivo son: Pielonefritis aguda, Pielonefritis crónica y Cistitis.

microorganismo	reducción de NO ₃ ⁻
<u>Escherichia coli</u>	+
<u>Proteus sp.</u>	+
<u>Klebsiella sp.</u>	+
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	+
<u>Streptococcus fecalis</u>	-
<u>Streptococcus pyogenes</u>	-
<u>Staphylococcus aureus</u>	+
<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	-
<u>Mycobacterium tuberculosis</u>	-
<u>Haemophilus sp.</u>	+
<u>Aerobacter sp.</u>	+
<u>Citrobacter sp.</u>	+

Sensibilidad

El sector de nitritos detecta desde 0.5 mg de nitrito/l de orina mediante una tenue coloración rosa, dando un máximo de - garantía, mientras que la "N"-Multistix es sensible a 1 mg/l de orina (18,25).

En estudios realizados por Guignard y Torrado (11) y Sinaiotis y cols. (24) con el "Cobur 8 test" encontraron que tanto las infecciones urinarias sintomáticas como las asintomáticas - que dan resultados de nitritos positivos indican 10⁵ colonias / ml. En comparación con un urocultivo que determina una bacteriuria, se observa que el sector de nitritos no detecta un 40 % de

las infecciones, como se observa en el cuadro No. 1; Kunin y De Goot (11) sugieren que para disminuir el porcentaje de falsos negativos y aumentar la sensibilidad del sector de nitritos se deben usar 3 series de muestras de la primera orina de la mañana.

	Cultivo positivo	Cultivo negativo	Total
NO ₂ positivo	9	0	9
NO ₂ negativo	6	1043	1049
	15	1043	1058

Cuadro No. 1: Comparación de un urocultivo y la prueba de NO₂ en detección de la bacteriuria asintomática usando 1058 muestras de niñas de 5 a 12 años.

Especificidad

Únicamente el nitrito puede formar una sal de diazonio en orina. Por tal razón están excluidas las reacciones falsas positivas. La fenazopiridina eliminada puede aparecer como una reacción positiva al analista poco experimentado. La tira puede detectar del 88 al 100 % de las enfermedades del aparato genito-urinario.

Inhibidores

El único inhibidor encontrado hasta la fecha es el ácido - ascórbico, cuando la orina contiene 100 mg/dl disminuye su sensibilidad y esto se ha confirmado por el estudio realizado por Scheifere y cols. (22) en donde no se detecta una infección debida a E. coli por la frecuente acidificación de la orina del - paciente con ácido ascórbico. Es importante hacer notar que no todos los microorganismos patógenos que producen infecciones -- urinarias reducen al nitrato.

Estabilidad

- 1) Sensible a la acción de la humedad del aire.
- 2) Sensible a humos industriales.
- 3) Son estables en el envase original hasta la fecha de ca ducidad indicada en la etiqueta.
- 4) Al almacenar las tiras en frasco embar a 4°C, no se pier de la potencia durante un período de 9 meses (22).

Fuentes de error

Las causas de error son debidas a (22):

- a) Insuficiente concentración de bacterias ($< 10^6$ cola./ml) que poseen nitrato reductasa.
- b) Poco período de incubación de la orina en la vejiga.
- c) El no realizar rápido la prueba (no debe tenerse más de 4 hrs. después de la micción) para evitar ulterior reduc

ción del NO_2 en N_2 ó NH_4

- d) Tratamiento con antibióticos y quimioterapéuticos durante la obtención de muestra.

SECTOR DE pH

El papel reactivo es de color amarillo-anaranjado y con papel hidrófobo.

El pH de la orina es el reflejo de la capacidad del riñón para mantener una concentración normal de hidrogeniones en el plasma y líquido extracelular. La actividad metabólica del cuerpo produce ácidos no volátiles que no pueden ser depurados por los pulmones (principalmente ácido sulfúrico, fosfórico, clorhídrico y pequeñas cantidades de ácido láctico, pirúvico y cítrico, además de algunos cuerpos cetónicos). Estos ácidos son excretados por el glomérulo con los cationes, principalmente el sodio. Las células tubulares cambian hidrogeniones por el sodio del filtrado glomerular y la orina se hace ácida (8).

El pH de la orina puede variar en muestras al azar desde 4.5 a 8.2. Esta capacidad para eliminar cantidades variables de ácidos o bases es de máxima importancia y hace del riñón el mecanismo de equilibrio, contra cambios drásticos en el pH del cuerpo y en la composición catión-anión (27).

Mecanismo de acción y contenido

El sector está impregnado de:

- a) Rojo de metilo
- b) Azul de bromotimol

El mecanismo de acción se explica de la siguiente manera: los 2 indicadores mezclados tienen intervalos similares de transición tales que sus colores ácidos se combinan dando un matiz que es el complemento del resultado de la combinación de sus colores básicos (7).

Valores de referencia

Para una persona sana con dietas ordinarias, el pH urinario es de aproximadamente 6.0. Normalmente el funcionamiento de los riñones puede producir una orina con una concentración de hidrogeniones desde 4.5 a 8.2 unidades de pH, ya que se encuentra influenciado por la alimentación, en una alta ingesta de proteínas el pH se vuelve ácido mientras que un pH básico se manifiesta por la ingesta predominante de vegetales (8,15).

Alteraciones

Encontramos alteraciones en el pH o en el intercambio de hidrogeniones cuando está afectada la función renal y en infecciones bacterianas, el pH puede ser ácido o básico dependiendo de los productos finales del metabolismo bacteriano.

Sensibilidad

La combinación de los 2 indicadores permite una diferenciación en la zona de pH de 5 a 9 unidades, puede detectar intervalos de 0.5 unidades entre este rango.

Al comparar la precisión del pH de la tira "Combur 8 test" con la tira "N"-Multistix se encontró que fue mejor el "Combur-8". La tira "N"-Multistix tiene una precisión pobre al medir el pH de 9 debido a que el amortiguador de citrato, un reactivo -- ácido que se encuentra en el sector de proteínas adyacente al - sector de pH se mezcló con el reactivo indicador de pH, lo cual no ocurre en el "Combur 8" (25).

En estudios realizados se encontró que las variaciones no se encuentran uniformemente distribuidos en todos los niveles - de pH, al agruparlos en 3 grupos: pH de 4.5-5.0; 5.5-8.0 y de - 8.5-9.0, las mayores variaciones se encuentran en el rango de - 5.5-8.0 y las menores variaciones en los otros 2 grupos (15).

Especificidad

Tiene una alta especificidad ya que los indicadores de pH que contiene no reaccionan con las otras sustancias presentes - en la orina (18).

Inhibidores

No se han encontrado sustancias o medicamentos que produzcan disminución en el pH, a excepción del ácido ascórbico.

Estabilidad

- 1) Sensible a la humedad
- 2) Estable hasta la fecha de caducidad que contiene la etiqueta (18).

Fuentes de error

En estudios realizados por James P. Gordon (15) y Brerenton D. M. y cols. (6) demostraron que en este sector, el resultado está en función de la percepción del color en cada bloque y de la composición de la muestra. En la tira "N"-Multistix influye el tiempo de reacción ya que después de sumergirse la tira y exponerla al aire se observa un aumento en el pH a los 120 seg. ; pero esto no ocurre en el "Combur 8 test".

SECTOR DE PROTEINAS

El papel es de color amarillo sin papel hidrófobo.

Normalmente la orina no contiene proteínas o puede contenerlas en cantidades muy pequeñas, debido a que los glomérulos impiden el paso de la albúmina y de las proteínas plasmáticas de mayor peso molecular desde el plasma al filtrado glomerular. La medición de la cantidad de proteínas excretadas pueden ser de utilidad para el diagnóstico y control de la evolución de enfermedades; principalmente del riñón.

Las proteínas presentes en la orina reflejan a las proteínas presentes en el plasma junto con las proteínas de origen tu

bular renal y las de los exudados de los tejidos que revisten al tracto urinario. Las proteínas presentes en la orina son: - albúmina, globulinas (predominantemente α_1 y α_2), prealbúmina, productos de fibrinólisis, transferrina, haptoglobina, ceruloplasmina, fracciones de inmunoglobulinas de cadena ligera.

Mecanismo de acción y contenido

El sector de proteínas está constituido de:

- a) Tetraclorofenoltetrabromosulftaleína
- b) Amortiguador de pH ácido

El mecanismo se basa en el error proteico de indicadores.- El indicador se encuentra en forma ácida HI con una pequeña -- fracción de la forma básica I^- . Si la proteína está presente, - los grupos amino se enlazan con la forma aniónica, con la que - tienen una gran afinidad. El cambio de la forma aniónica I^- -- causará una disminución de la forma ácida HI, formando compuestos de color verde pálido a verde o azul. El color presentado - por la tira reactiva depende de la proporción relativa de las 2 formas (I^-/HI) (25,26).

Valores de referencia

La orina normal contiene pequeñas cantidades de proteínas, aunque los glomérulos intactos generalmente impiden el paso de la albúmina y de las proteínas plasmáticas mayores, desde el -- plasma al filtrado glomerular; la concentración de proteínas excretadas diariamente es de 2 a 8 mg/dl

Alteraciones

Se encuentran diferentes grados de proteinuria en: glomerulonefritis, poliarteritis, lupus eritematoso, nefrosclerosis, -mieloma múltiple, policitemia vera, cistitis, prostatitis, pielonefritis, diabetes mellitus, mixedema, uretritis y enfermedades hemorrágicas (8,17).

Sensibilidad

El sector es sensible a 25 mg/dl, según el número de grupos amino libres de las diversas fracciones proteicas. Es con gran diferencia más intenso para la albúmina y mucho más débil para las globulinas, glucoproteínas, mucoproteínas, etc.

En un estudio realizado en orinas con la misma concentración de proteínas séricas totales y albúmina respectivamente, es más intenso el color obtenido en orinas que contienen albúmina que las que poseen proteínas séricas totales. Al comparar la tira "N"-Multistix y el "Combur 8 test" es más definido el color de negativo a positivo en esta última (18,25).

Especificidad

La especificidad es baja ya que se pueden obtener resultados falsos positivos provocados por un pH elevado. Resultados inespecíficos pueden estar condicionados por la eliminación de azul de metileno, azul de fenazopiridina, debido a que dificultan la lectura. Falsos positivos por la eliminación de polivinilpirrolidone, quinina, derivados químicos y alcaloides elimi-

nados en general (18).

Inhibidores

No se han encontrado sustancias que produzcan una disminución de la sensibilidad, aunque se han encontrado resultados negativos en la globulinuria predominante, proteinuria de Bences-Jones y en la albuminuria mínima.

Estabilidad

- 1) Las tiras son sensibles a la humedad y deben guardarse con el desecante que contiene el tapón del envase.
- 2) Son estables hasta la fecha de caducidad impresa (18).

Fuentes de error

Para disminuir errores se debe tener precaución de:

- a) Suprimir la ingesta de medicamentos unos días antes de la prueba.
- b) La orina no deberá permanecer más de 4 hrs. a temperatura ambiente.

SECTOR DE GLUCOSA

El papel reactivo es de color amarillo con papel hidrófobo.

La determinación de la glucosa urinaria es uno de los análisis más ampliamente utilizados en los laboratorios clínicos ; su presencia indica generalmente diabetes mellitus; esta enfermedad es de las más frecuentes, de aquí la importancia de su de

tección y control.

Para encontrar glucosuria es necesario que la glucosa verdadera de sangre venosa sobrepase los 160 mg/dl (umbral renal). El análisis de la glucosa urinaria es una técnica común usada clínicamente para estimar los niveles de glucosa sanguínea indirectamente, debido a que se obtiene fácilmente la muestra. Estudios realizados para corroborar si existe una correlación entre la concentración de glucosa sanguínea y la urinaria por medio de pruebas rápidas, demuestran que es muy poca la relación entre ellos, ya que las diferencias son muy variables (1). La glucosa del filtrado glomerular se reabsorbe de los túbulos, la máxima capacidad de resorción tubular es de 160 mg/dl aproximadamente. Cuando las concentraciones de glucosa son mayores a este valor aumenta la concentración en orina siendo fácilmente detectable (8).

Barnett (25) ha establecido diferencias en los resultados obtenidos en soluciones acuosas y soluciones preparadas con fluidos biológicos de las mismas concentraciones indicando la presencia de sustancias de interferencia en las últimas soluciones.

Mecanismo de acción y contenido

El sector contiene:

- a) Enzima glucosaoxidasa (GOD)
- b) Enzima peroxidasa (POD)
- c) 3-amino-6-cloro-9-N-dimetilaminopropilcarbazol-dihidrocioruro (Cl-APAC)

d) Amortiguador ácido

La reacción es la siguiente (Fig. 3): la GOD oxida selectivamente la glucosa en ácido glucurónico formando peróxido de hidrógeno en presencia de oxígeno atmosférico. A fin de que la reacción resulte visible se agrega la denominada reacción indicadora, demostrando el peróxido formado en la primera fase, con ayuda de una reacción cromática acoplada, el cromógeno se oxida - bajo la acción de la peroxidasa (POD). No se conoce el producto exacto de la oxidación del cromógeno (18,25).

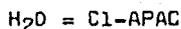
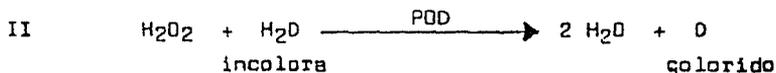
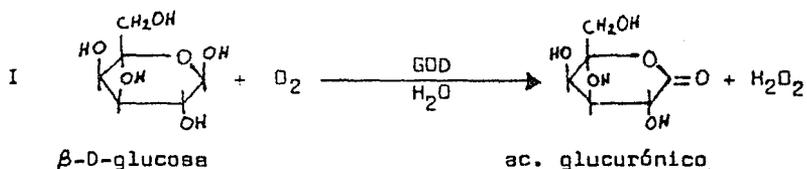


Figura No. 3

Valores de referencia

La orina normal no se haya completamente libre de glucosa. Se ha evidenciado que también en condiciones glucémicas normales y con reabsorción tubular normal llega a la orina una pequeña cantidad de glucosa (17,18). Existe discrepancia entre los -

autores para establecer la cantidad de glucosa excretada, pero se toma un rango de 15 a 20 mg/dl de orina.

Alteraciones

La glucosa se encuentra elevada en la diabetes mellitus, - lesiones cerebrales, hipertiroidismo, pancreatitis, acromegalia, enfermedad tubular renal (Síndrome de Fanconi), infarto al miocardio e infecciones (microbianas agudas).

Sensibilidad

La tira "Combur 8 test" es hipersensible a concentraciones de 0.5 g de glucosa/l de agua; cualquier solución acuosa de más de 0.5 g/l produce un color equivalente a un resultado de 20 g/l. Esta hipersensibilidad fue previamente observada por Dyerberg y cols., experimentaron una considerable menor sensibilidad -- cuando la prueba de glucosa se realizó con orina en lugar de - agua, probablemente porque la orina contiene un número de com - puestos que tienden a inhibir las reacciones analíticas aplicadas en el experimento, particularmente ciertas drogas (10,25).

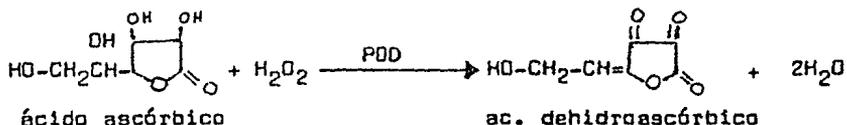
En una comparación de la tira "Combur 8" con la Clinistix, se demostró que la primera obtuvo resultados normales y en la - segunda hubo 4 falsos positivos, 7 falsos negativos y varios re sultados dudosos (10).

Especificidad

De acuerdo a los datos de Schmidt (18), puede atribuirse a la enzima GOD una especificidad absoluta. Hasta el momento solo se ha observado una reacción significativa con la 2-desoxiglucosa, un azúcar que no se encuentra comunmente en la orina. La localización de factores que alteran la reacción indicadora en el proceso reactivo se muestra en la fig. No. 4.

Inhibidores

- Acido ascórbico, una ingesta elevada de este aparece en la orina después de 3 a 5 hrs. de su ingestión. El ácido ascórbico disminuye la sensibilidad de la tira, encontrando falsos positivos en diabéticos y enfermos con un bajo umbral renal para la glucosa. El ácido ascórbico puede afectar en el sistema GOD-PDD-cromógeno a diferentes niveles: 1) en la interferencia de la reacción con la oxidasa; 2) compete por el sustrato de la PDD; 3) los radicales libres del ascorbato también interfieren en la reacción, provocando cambio de color, los cuales provienen de la auto-oxidación del ascorbato y la PDD-cataliza la producción de los mismos (5,10,23).



- El ácido homogentisínico solo en elevadas concentraciones produce inhibición.

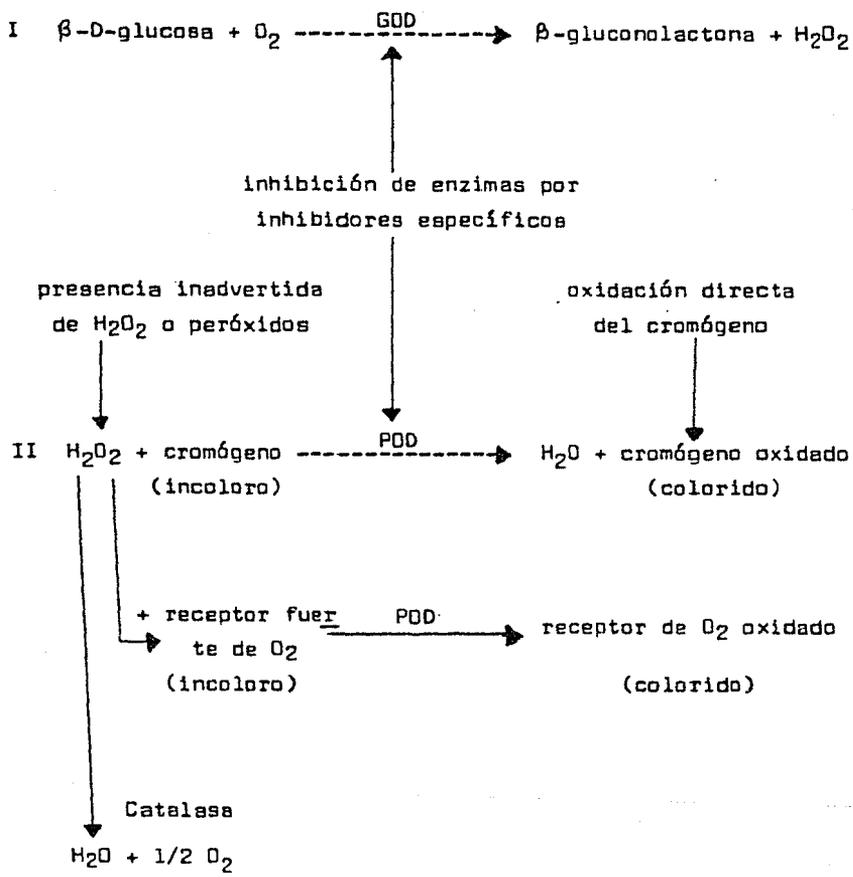
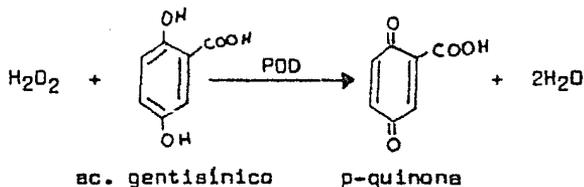


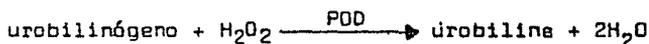
Figura No. 4. Con líneas punteadas (----) se marca el camino que sigue la reacción de la glucosa, dividida en 2 pasos. Las interferencias se pueden producir a 3 niveles: enzimas, cromógeno y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) obtenido en el primer paso, ocasionando resultados falsos positivos o falsos negativos (—).

- El ácido gentisínico es otro metabolito que compete por el -- oxígeno



La p- quinona es de color gris pardo. Si existe glucosa y ácido gentisínico en la orina torna de color gris pardo la tira-reactiva.

- El urobilinógeno tiene poca inhibición



- El 3,4-hidroxifenilacético es otro inhibidor, en general los-componentes urinarios intensamente reductores, entre estos se tiene: ácido úrico, mucoproteínas, 5-hidro-indolacético (inhibe a partir de 25 mg/dl).
- El acetato de mercurio también produce inhibición.

Estabilidad

- 1) Son sensibles a la humedad
- 2) Estables hasta la fecha de caducidad si permanecen las tiras dentro del envase con el tapón con desecante (18).

Fuentes de error

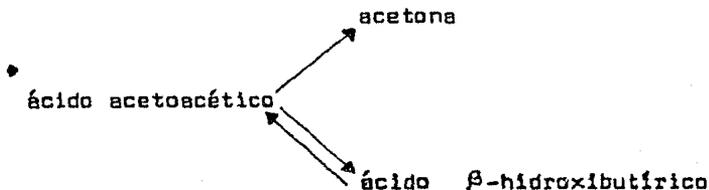
Para disminuir el número de errores se deben controlar las siguientes variables:

- a) No usar ácidos fuertes o carbonato sódico como conservadores de la orina, para que no rebace la capacidad amortiguadora del sector.
- b) Disminuir la ingesta de vitamina C (ácido ascórbico) -- días antes de realizar la prueba.

SECTOR DE CUERPOS CETONICOS

El área reactiva tiene color amarillo con papel hidrófobo.

Los cuerpos cetónicos presentes en la orina son: ácido acético (20 %), acetona (2 %) y ácido β -hidroxibutírico (alrededor del 78 %). La acetona se forma por descarboxilación espontánea e irreversible del ácido acetoacético. El ácido β -hidroxibutírico es reversible con ácido acetoacético (19,27).

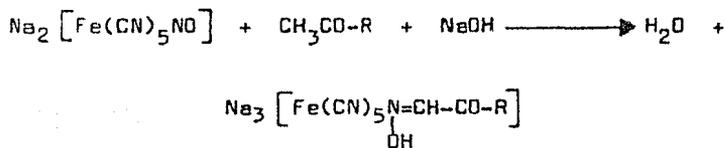


Mecanismo de acción y contenido

El área reactiva contiene:

- a) Nitroprusiato sódico
- b) Glicina
- c) Amortiguador alcalino

En la reacción el ácido acetoacético y la acetona en medio alcalino con glicina como fuente de N_2 forman un complejo de color violeta con nitroprusiato. Según Fiegl el mecanismo es: el ácido acetoacético se condensa con el grupo NO del nitroprusiato dando un derivado isonitroso, éste se inserta en el anión -- complejo. Simultáneamente ocurre reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} (18, 25). Fig. No. 5



R = CH_3 acetona

R = CH_2COOH ac. acetoacético

Figura No. 5

Valores de referencia

Según los métodos empleados, los cuerpos cetónicos totales oscila entre 1.7 y 4.2 mg/dl (Henry 1964). De acuerdo con Killander y cols. (1962) se considera como referencia hasta 2 mg/dl -

de ácido acetoacético.

Alteraciones

La causa de la cetosis es una alteración del metabolismo de carbohidratos y grasas; debido a la deficiente utilización de glucosa se produce lipólisis aumentada y con ello elevación del aporte de ácidos grasos libres y acetyl coenzima A. Este último se utiliza tan solo en parte a través del ciclo del ácido cítrico o síntesis de grasas. El exceso se condensa en acetoacético eliminándose parcialmente a través del riñón. Por reducción surge el ácido β -hidroxibutírico y por descarboxilación acetona.

Cualquier diabético, por bien adaptado que esté, es susceptible a desviaciones de este equilibrio. Un síntoma precoz del coma imminente es la cetonuria, especialmente si se presenta con glucosuria elevada. Por tal razón se exige la demostración sistémica de la glucosa y cuerpos cetónicos. Debe tenerse presente que la cetonuria puede ser expresión de lipólisis aumentada, y si el paciente está sometido simultáneamente a un régimen reductor de peso, la cetonuria puede ser inofensiva. No existe una conexión inequívoca entre cetonuria y contenido cetónico de la sangre, cuando el nivel sanguíneo de cuerpos cetónicos sobre pasan de 6-8 mg/dl en forma de acetona se encuentran cuerpos cetónicos en orina (19,27).

La cetonuria se desarrolla en una variedad de condiciones como: enfermedades febriles agudas y tóxicas acompañadas del --

vómito y diarrea. También en enfermedades del depósito de glucógeno (Von Gierke) sin omitir la diabetes mellitus.

Sensibilidad

La sensibilidad para el ácido acetoacético es de 5 a 10 -- mg/dl y para la acetona es de 40 a 70 mg/dl. La relación entre acetona y ácido acetoacético es aproximadamente 1:10. La tira - no detecta el ácido β -hidroxibutírico (8,25).

Especificidad

La reacción no es estrictamente específica, sin embargo el ácido acetoacético y la acetona son las únicas sustancias con - grupos cetónicos enolizables que se presentan en la orina.

Los medicamentos y colorantes que se eliminan por orina - pueden producir coloraciones con el amortiguador alcalino, como las fenilcetonas o las ftaleínas.

Inhibidores

- Metil cetonas y sustancias con grupos ceto-enolizables, reaccionan con el nitroprusiato (ejem: el ácido fenilpirúvico, -- acetaldehído).
- L-dopa, L-dopamina y el ácido 3,4-hidroxifenilacético producen falsos positivos.

Estabilidad

Los envases que contenían tiras reactivas se destaparon 2- o 3 min diariamente, lo cual indica el período de uso diario, - durante 3 semanas. Se sellaron y guardaron por 4 semanas; des - pués de este tiempo se probaron, encontrando que perdieron su - sensibilidad; mientras que las tiras de un envase que se abrió - 5 veces y se guardó por 9 meses continuó detectando las cetonas a este tiempo.

Fuentes de error

Los parámetros a controlar son: (8,18)

- a) Análisis de la muestra lo más pronto posible, la aceto - na se pierde a temperatura ambiente, pero no si se guar - da en refrigeración.
- b) Según la temperatura y el pH, el ácido acetoacético se descompone rápidamente en acetona y CO_2 . Como las tiras son menos sensibles a la acetona, la descarboxilación - progresiva significa pérdida de la sensibilidad. A 30°C no hay pérdida del ácido acetoacético por una semana.
- c) La acción bacteriana causa pérdida del ácido acetoacéti - co tanto in vivo como in vitro.

SECTOR DE UROBILINOGENO

El papel reactivo es de color blanco sin papel hidrófobo.

Se denomina urobilinógeno a los productos finales del metabolismo de la bilirrubina: mesobilinógeno, estercobilinógeno y urobilinógeno. La determinación del urobilinógeno en orina es - de valor clínico en la evolución de enfermedades y transtornos hepáticos (19). Después que la bilis es excretada en el intestino, la bilirrubina conjugada se reduce por la acción de las bacterias a mesobilirrubina, estercobilinógeno y urobilinógeno. El estercobilinógeno y urobilinógeno son incoloros y fácilmente se oxidan para dar pigmentos cromados urobilina y estercobilina. - Es usual referirse a estas sustancias como urobilinógeno y uro- bilina, las concentraciones de estercobilinógeno y de estercobi- lirrubina suelen ser más elevadas que las de los derivados men- cionados (17).

Los productos reducidos de bilirrubina son resorbidos en - la circulación portal, para ser excretados por el hígado. Parte del urobilinógeno y estercobilinógeno resorbidos se excretan -- por la orina junto con mesobilirrubinógeno. La urobilina, forma oxidada del urobilinógeno se encuentra en la orina normal. El - aumento en la producción de bilirrubina ocasiona incremento - en el contenido de urobilinógeno de la orina. (8).

Mecanismo de acción y contenido

El área de urobilinógeno está impregnado de:

- a) p-metoxibenzoldiazonio-tetrafluoroborato con amortiguador ácido.

En la reacción el urobilinógeno se acopla con la sal de diazonio para dar un color rojo carmín. En ensayos cuantitativos se ha demostrado que una molécula de urobilinógeno consume 4 moléculas de la sal de diazonio. Mediante cromatografía en capa fina se pudo identificar un solo producto de la reacción (18).

Fig. 6

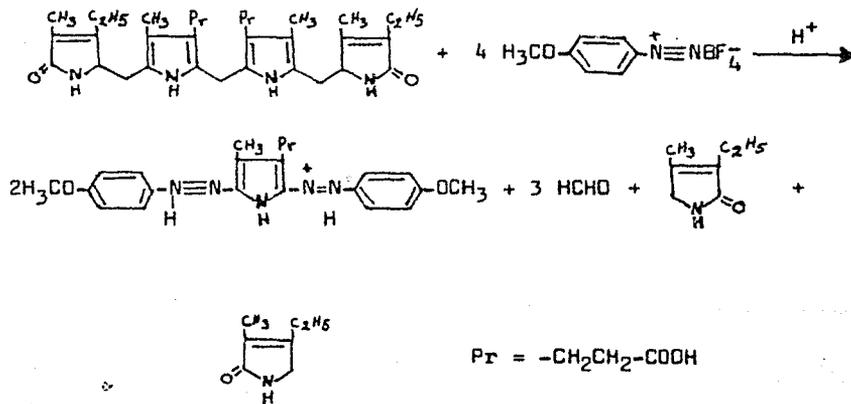


Figura No. 6

Valores de referencias

La orina de un adulto normal contiene alrededor de 0.5 a-2.5 mg/dl de urobilinógeno en una muestra de 24 hrs.; se excre-

ta menos de 1 unidad Ehrlich/2 hrs. cuando se mide con un método semicuantitativo (1 unidad Ehrlich = 1 mg/dl) (2).

Alteraciones

El urobilinógeno se encuentra elevado en trastornos hepáticos (hepatitis asintomática, cirrosis hepática) debido a la incapacidad de los hepatocitos de resorber los urobilinógenos de la sangre portal y retornarlos a la bilis. Otras enfermedades en las que se encuentra elevado son: ictericia hemolítica, insuficiencia cardíaca congestiva, mononucleosis infecciosa y policitemia.

Sensibilidad

Sensible a 1 mg de urobilinógeno/dl de orina. No se han -- realizado análisis detallados de urobilinógeno, pero los resultados entre el "N"-Multistix y el "Combur 8" son comparables -- entre sí y ambas son menos sensibles que la reacción clásica de Ehrlich (25).

Especificidad

La bilirrubina origina en ocasiones, después de 1 min. coloración verde gris. Ensayos in vitro ponen de manifiesto que la bilirrubina reacciona con la sal de diazonio del sector. Esta reacción sin embargo es más lenta y no perturba la demostración de urobilinógeno. El ácido p-aminosalicílico da una reacción cruzada con el urobilinógeno (18,25).

Inhibidores

- El porfobilinógeno a la concentración de 100 mg/dl origina -- una leve coloración rosa, esta se presenta después de 1 min.
- La fenazopiridina produce una coloración roja con el amortiguador ácido que contiene el sector.
- El formaldehído interfiere cuando la concentración es superior a 200 mg/dl, el cuál se presenta en intoxicación con formol - o metanol y en la terapia masiva con hexametilentetramina - - (18).

Estabilidad

- 1) Las tiras reactivas son sensibles a la humedad.
- 2) Los envases sin abrir arrojaron todavía buenos resultados al cabo de 2 años (18).

Fuentes de error

Para obtener resultados confiables se deben controlar los siguientes parámetros:

- a) Orina fresca, debido a que el urobilinógeno se oxida rápidamente, para esto se debe realizar la prueba en los 30 min. que siguen a la emisión de la muestra.
- b) Proteger la muestra de la luz, para evitar la oxidación de la misma.
- c) Evitar el uso de formaldehído como conservador.

- d) Evitar la ingesta o suspensión de antibióticos, si se están tomando, debido a que la prueba carece de valor diagnóstico, ya que estos inhiben las bacterias intestinales que forman urobilinógeno (19).

SECTOR DE BILIRRUBINA

El sector de bilirrubina es de color blanco nítido sin papel hidrófobo.

La bilirrubina presente en la orina es la conjugada que proviene de (2,19):

- a) 80 % de la hemoglobina de los glóbulos rojos viejos que han llegado al final de su ciclo vital de 120 días.
- b) 20 % de fuente diferente de los eritrocitos viejos. Estudios con glicina marcada N_2^{15} sugieren que podría tratarse en gran parte de la hemoglobina de glóbulos rojos jóvenes, quizá expulsada con los núcleos durante la maduración de eritrocitos.
- c) Una pequeña parte proviene de otros compuestos de hemo como mioglobina, citocromos, peroxidases y catalasas.

El metabolismo de la bilirrubina se describe en la fig. Nº

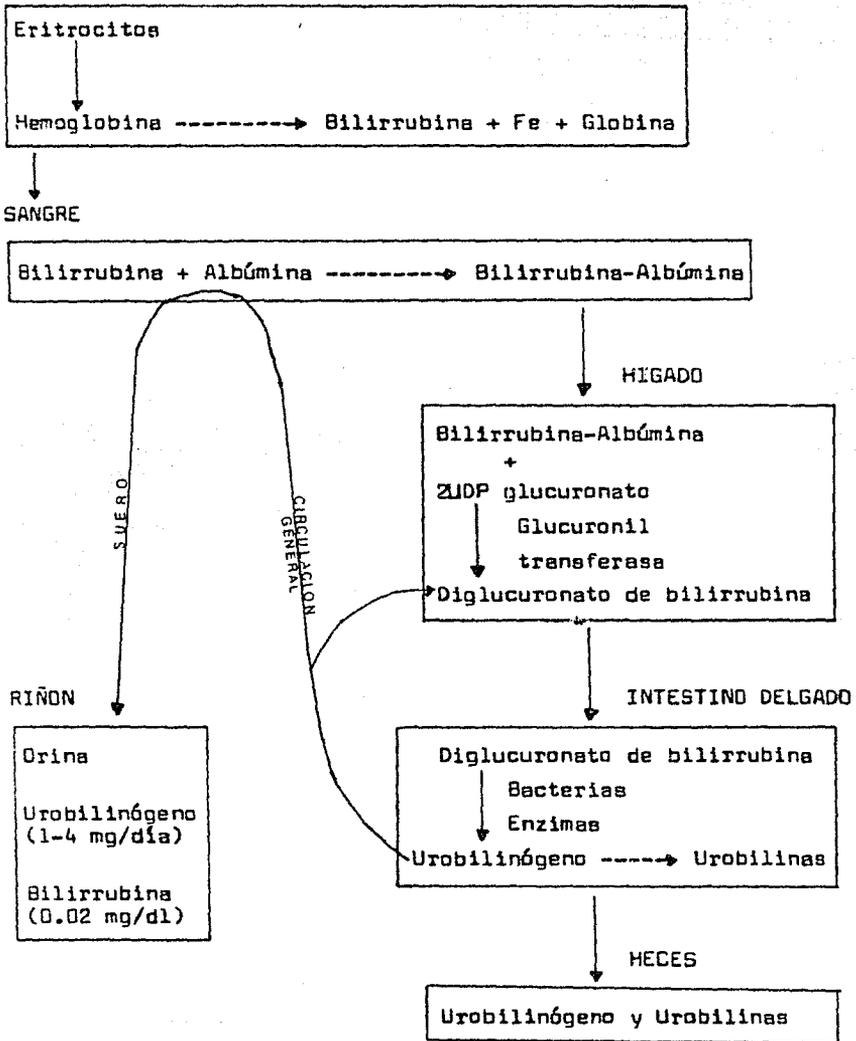
8.

Mecanismo de acción y contenido

El sector contiene:

- a) 2,6-diclorobenzoldiazonio-tetrafluoroborato en amortiguador ácido.

S.R.E. (bazo y médula ósea)



METABOLISMO DE LA BILIRRUBINA

La reacción es la siguiente: la bilirrubina es detectada - al acoplarse con la sal de diazonio en medio ácido, dando como resultado un color ante (piel) hasta un débil rosa-café, los resultados se reportan como pequeño, moderado y grande (18,25).

Fig. No. 7

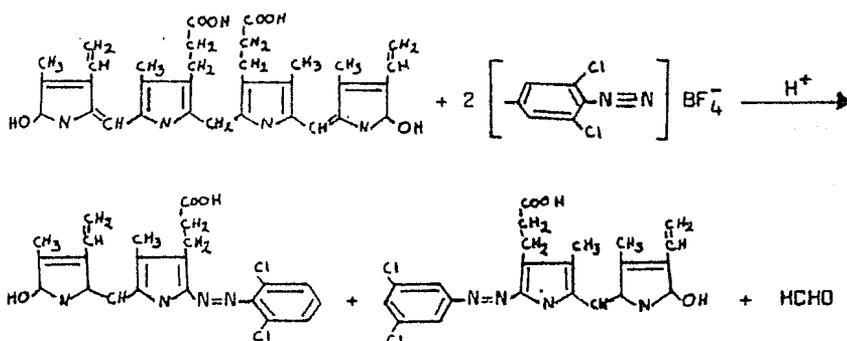


Figura No. 7

Valores de referencia

La orina normal casi no contiene bilirrubina, el valor medio es de 0.02 mg/dl y generalmente se encuentra elevada en enfermedades hepáticas.

Alteraciones

Valores anormales sugieren enfermedades hepatocelulares -- (hepatitis viral y tóxica, cirrosis biliar primaria, etc), icte_ricia fisiológica neonatal y anemias.

Sensibilidad

El límite de detección es de 0.5 mg/dl aunque el color proporcionado o el límite de sensibilidad depende de la interpretación individual de cada técnico (6,25).

Especificidad

La prueba no es muy específica, pero no se han reportado falsos positivos. Se observa que a cantidades elevadas de urobilinógeno en orina varía el color de la prueba pero no en el sentido de una indicación positiva. Se encuentran reacciones falsas positivas provocadas por medicamentos como la fenazopiridina.

Inhibidores

- El ácido ascórbico disminuye la sensibilidad de la prueba.
- Un pH ácido provoca disminución de la sensibilidad (18).

Estabilidad

- 1) El sector es sensible a la humedad.
- 2) No debe almacenarse cerca de radiadores.
- 3) Estable en el envase original hasta la fecha de caducidad (18).

Fuentes de error

Para evitar resultados erróneos es recomendable controlar las siguientes variables:

- a) Realizar rápidamente la prueba, debido a que la bilirrubina se oxida con bastante rapidez a biliverdina.
- b) No filtrar ni centrifugar la orina, ya que los precipitados de carbonato de calcio o fosfato de calcio adsorben la bilirrubina intensamente.

SECTOR DE SANGRE

El papel reactivo es de color amarillo sin papel hidrófobo.

La presencia de un número anormal de eritrocitos en orina se denomina hematuria, mientras que el término hemoglobinuria indica presencia de hemoglobina disuelta. El número aumentado de eritrocitos puede originarse en cualquier parte del sistema urinario. Cuando se observa aumento de eritrocitos y cilindros hemáticos es probable que el origen de la hematuria sea renal. La hematuria masiva se encuentra asociada a traumatismo del riñón o del aparato excretor. Mientras que la hemoglobinuria, es consecuencia de un aumento brusco y transitorio de la concentración plasmática, casi siempre se debe a hemólisis intravascular o indica la desintegración de eritrocitos dentro de vías urinarias, generalmente en vejiga (8).

Valores de referencia

No se encuentran eritrocitos en la orina de personas clínicamente sanas.

Alteraciones

Se encuentra hematuria en: glomerulonefritis, tuberculosis, síndrome nefrótico, pielonefritis aguda y crónica, infarto renal, trombosis de vena renal, riñón poliquístico, tumores, apendicitis aguda, paludismo, endocarditis bacteriana subaguda, cistitis. En algunas ocasiones en: lupus eritematoso, linfomas, neumonía vírica, hemólisis intravascular grave (transfusión de sangre incompatible) e infecciones (Clostridium sp.) (3,17).

Sensibilidad

En estudios realizados por Smith y cols. (25) demostraron que el "Combur 8" es sensible a 5 eritrocitos intactos y a 10 eritrocitos lisados/microlitro.

Especificidad

Es bastante específico el sector de sangre, ya que los reactivos no reaccionan con las peroxidases procedentes de otros componentes celulares de la orina, como epitelios, espermatozoides, leucocitos. Se ha encontrado que reacciona positivamente con la mioglobina a concentración de 0.05 mg/dl pero la eliminación normal de mioglobina se encuentra por debajo de 0.03 mg/dl un resultado negativo podría excluir una mioglobinuria patológica

ca.

En la fig. No. 10 se muestra un esquema en donde se observa el mecanismo de la reacción y las posibles fuentes de error. Se creía que una bacteriuria elevada podría provocar una reacción positiva debido a peroxidasas bacterianas. A 20 orinas libres de sangre se añadieron bacterias dejando toda la noche a temperatura ambiente, los análisis con tiras fueron negativos, por lo tanto las peroxidasas bacterianas no influyen en este sector (18).

Se pueden producir falsos positivos con hipoclorito de sodio a una concentración de 100 mg/dl, mientras que los yoduros producen a una concentración por encima de 5 g/l.

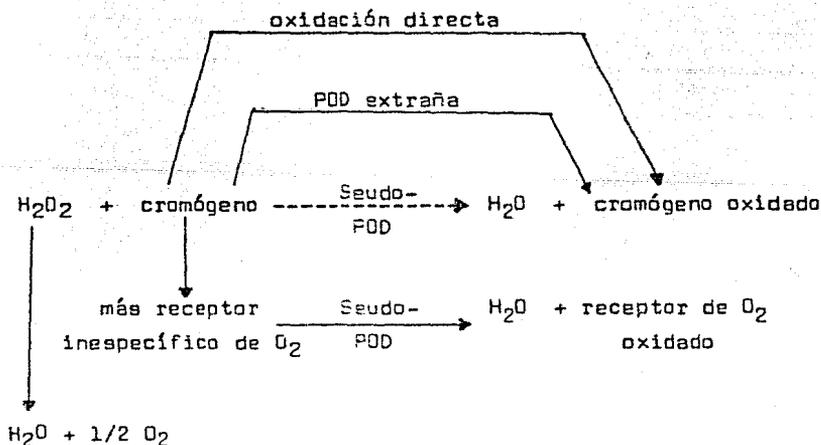


Figura No 10. Curso normal de la reacción (----); posibilidades de resultados falsos positivos y falsos negativos (—).

Inhibidores

- Al aumentar la concentración del ácido ascórbico disminuye la sensibilidad del sector de sangre.

ácido ascórbico	lectura de la orina sin ácido ascórbico	lectura de la orina sin ácido ascórbico
500 mg/dl	3+	2+
2 g/dl	3+	1+

Tabla No. 3 La concentración de sangre es de 400 eritrocitos/ μ l.

Estabilidad

- 1) Las tiras son sensibles a la humedad.
- 2) El envase cerrado es estable hasta la fecha de caducidad (18).

Fuentes de error

Para evitar obtener resultados falsos positivos deben tenerse en cuenta:

- a) Limpieza de los recipiente colectores de orina.
- b) Suspensión de ingesta de medicamentos que provocan hematuria o hemoglobinuria como la sulfanilamida, salicilatos, ciclofosfamida, quinina, arsénico, etc.

CAPITULO III
MATERIAL Y METODOS

Material

- Agitador para celdas
- Algodón
- Barras magnéticas
- Bureta de 20, 10 y 5 ml.
- Cronómetro
- Embudos de talle corto
- Espátulas
- Gradilla
- Matraz volumétrico de 1000, 500, 200 ml.
- Matraz volumétrico de 100, 50, 25 y 10 ml.
- Matraz volumétrico de color amber de 100, 50 y 25 ml.
- Papel aluminio
- Papel filtro
- Papel parafilm
- Perilla
- Pipetas graduadas de 10, 5, 2, 1, 0.2, 0.1 y 0.01 ml.
- Pipetas volumétricas de 25, 10, 5 y 1 ml.
- Pipeta semiautomática de 0.01 y 0.1 ml.
- Probetas de 500, 100, 50 y 25 ml.
- Probetas de 500, 100, 50 y 25 ml.

- Tijeras
- Tubos de ensaye de diferentes tamaños
- Vasos de precipitados de 1000, 600, 250, 100, 50 y 10 ml.

Equipo

- Agitador magnético Corning PC-353
- Agitador magnético Magestir cat. 1250
- Baño serológico
- Centrifuga Solbat Mod. J-12
- Balanza analítica Sartorius 2006 MP
- Espectrofotómetro Eppendorf 1101M
- Parrilla
- Potenciómetro Philips Pw 9409 digital
- Vortex

Reactivos

- Acetato de sodio
- Albúmina
- Amortiguador de acetato pH 5.3 2M
- Amortiguador de K_2HPO_4 de pH 5,6,7,8 y 9
- Amortiguador de fosfato de potasio pH 7.0 0.1M
- Amortiguador de fosfato de potasio pH 5.0 0.1M
- Amortiguador de fosfato de potasio pH 6.8
- Amortiguador de fosfato de potasio pH 8.0
- Amortiguador estandarizado de pH 4.008 y 7.413 (a 25°C).
- Acido metil ester

- Bilirrubina
- Cianuro de sodio 0.01M
- Colorante amarillo-anaranjado (gelborange) al 0.1%
- 4-dimetilaminobenzaldehído
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- 3-amino-9-aminopropil-dihidrocloruro (Cl-APAC)
- Etanol
- Etilenglicolmonometileter
- Glicina
- Glucosa
- HCl 2M
- HCl 0.1M
- HCl 2.5M
- HCl concentrado
- HCl al 10%
- HCl al 25%
- H_2SO_4 2.5M
- 3-hidroxi-3-oxobutirato-deshidrogenasa (3-HBDH)
- 3-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidrobenzo (h) quinolina (THBQH)
- Kit para bilirrubina
- Luviskol al 3%
- Metanol
- NADH- Na_2
- NaOH 0.1M
- NaOH 0.1N
- NaOH 0.2N

- NaOH 0.05N
- Ninhidrina
- Nitroprusiato de sodio (NNP)
- Nitrito de sodio al 0.05%
- Perhidrol al 30%
- Peroxidasa (POD)
- Propanol-2
- Saponina
- Estandar de sangre
- Sulfamato de amonio al 0.5%
- Sulfanilamida
- Sulfuro de sodio al 2%
- Tetrametilbencidina (TMB)
- Titan-IV-Cloruro
- Urobilinógeno

Métodos

SECTOR DE NITRITOS

Reactivos del sector	$\mu\text{mo}^1/\text{área de prueba}$
3-hidroxi-1,2,3,4,-tetrahidrobenzo(h)quinolina (THBCH)	> 60.5
Sulfanilamida	> 61.0

Pruebas de funcionamiento

Las tiras de los 5 lotes se sumergen durante 1 seg en soluciones de 0 y 0.05 mg de NaNO_2 de H_2O , eliminar el exceso de reactivo, después de 30 seg. comparar los colores de las tiras con colores patrones internos.

Determinación de reactivos del área

1. 3-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidrobenzo(h)quinolina (THBCH)

Procedimiento:

Extraer 15 papeles reactivos del sector de nitritos de cada uno de los lotes (con pinzas), depositarlos en vasos de precipitados de 50 ml. Eluir con 6.25 ml de metanol 3 veces y agitar magnéticamente durante 3 min., usar 2.5 ml para el último lavado. Colocar los eluatos en matraces volumétricos de 25 ml.- posteriormente adicionar 2.5 ml de NaOH 0.1N a cada matraz y -

aforar hasta la marca con metanol. Leer a 340 nm contra el blanco a temperatura de 25°C.

Blanco: en un matraz aforado de 25 ml pipetear 2.5 ml de NaOH - 0.1N y aforar con metanol.

Cálculo

$$[THBCH] = E_{340 \text{ nm}} \times 357.2 \text{ } [\mu\text{mol/área de prueba}]$$

2. Sulfanilamida

Procedimiento

En un tubo de ensaye colocar 1 ml de solución estandar de sulfanilamida (ver apéndice 8), sellar la boca del tubo con algodón e incubar en baño de agua a temperatura de 75-80°C hasta completa evaporación del metanol.

Extraer (con pinzas) 12 papeles reactivos del sector de nitratos de cada uno de los 5 lotes depositandolos en tubos de ensaye. A las pruebas y al estandar diluirlos con 5 ml de HCl al 10%. Colocar los tubos en baño de agua por 10 min a 80°C, agitar los tubos. Dejar enfriar las soluciones y filtrar (sol. de extracción).

Etiquetar 7 matraces de 25 ml. y adicionar:							
Matraces	Bl	Problemas					St.
		83156	82023	82945	81819	81670	
Reactivo							
Sol. estandar	-	-	-	-	-	-	1.00 ml
HCl al 10 %	1.00 ml	-	-	-	-	-	-
Sol. de extracción	-	1.00 ml	1.00 ml	1.00 ml	1.00 ml	1.00 ml	-
H ₂ O destilada	1.00 ml	1.00 ml	1.00 ml	1.00 ml	1.00 ml	1.00 ml	1.00 ml
NaNO ₂ al 0.05 %	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml
Agitar y reposar por 5 min.							
Sulfamato de emonio al 0.5 %	1.00 ml	1.00 ml	1.00 ml	1.00 ml	1.00 ml	1.00 ml	1.00 ml
Etenol al 96 %	10.00 ml	10.00 ml	10.00 ml	10.00 ml	10.00 ml	10.00 ml	10.00 ml
Agitar y reposar 5 min. Seguir con el siguiente esquema de pleteo							

t(min)	
0	Blanco + 1 ml de sol. reactiva* ----> aforar con H ₂ O destilada
1	Problemas + 1 ml de sol. reactiva* ----> aforar con - H ₂ O destilada
2	Estandar + 1 ml de sol. reactiva* ----> aforar con - H ₂ O destilada
4	Leer el blanco a 546 nm a 25 ^o C
5	Leer los problemas a 546 nm
6	Leer el estandar a 546 nm

* Ver apéndice B

Cálculo

$$[\text{Sulfanilamida}] = 76.3 \times \frac{E_{Pr}}{E_{St}} [\mu\text{mol/área de prueba}]$$

SECTOR DE pH

Reactivos del sector	η mol/área de prueba
Rojo de metilo (MR)	> 1.49
Azul de bromotimol (BTB)	> 8.0

Prueba de funcionamiento

Introducir las tiras reactivas de un lote, durante 1 seg.- en soluciones de K_2HPO_4 de pH 5, 6, 7, 8, y 9, sacudirlas para eliminar el exceso de reactivo, transcurridos 30 seg comparar con los colores internos. Lo mismo se realiza con los 4 lotes restantes.

Determinación de los reactivos del área

Procedimiento:

Extraer 30 papeles reactivos de cada uno de los 5 lotes, depositandolos en vasos de precipitados de 50 ml. Los papeles eluirlos con 6.25 ml de metanol 3 veces y 1 vez con 3.75 ml. , agitando durante 3 min cada vez. Recolectar las extracciones en matraces volumétricos de 25 ml, aforar con metanol y mezclar (sol. prueba). Seguir el siguiente esquema en las celdas

1. Rojo de metilo

Pipetear en celdas los siguientes reactivos:						
Reactivo	Bl	Problemas				
		83156	82023	82945	81819	81670
Sol. prueba	-	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml
Metanol	2.0 ml	-	-	-	-	-
HCl 2M	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Mezclar y leer los problemas a 546 nm y 25°C contra el Bl.						

Cálculo:

$$[MR] = (E_{546 \text{ nm}} \times 12.14) - (E_{623 \text{ nm}} \times 0.149) \left[\eta_{\text{mol/área de prueba}} \right]_{\text{bs}}$$

2..Azul de bromotímol

Pipetear en celdas los siguientes reactivos:						
Reactivo	Bl	Problemas				
		83156	82023	82945	81819	81670
Sol. prueba	-	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml
Metanol	2.0 ml	-m	-	-	-	-
NaOH 0.1M	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Mezclar y leer los problemas contra el blanco a 623 nm						

Cálculo:

$$[BTB] = E_{623 \text{ nm}} \times 28.43 \left[\eta_{\text{mol/área de prueba}} \right]$$

SECTOR DE PROTEINAS

Reactivos del sector	η mol/área de prueba
Tetraclorofenoltetrabromosulfoftaleína (TTS)	> 6.91
pH	3.6-3.8

Prueba de funcionamiento

Las tiras de los lotes se sumergen en soluciones de 0, 30, 100 y 500 mg de albúmina/100 ml de H₂O durante 1 seg, sacudir - para eliminar el exceso de reactivo y después de 30 seg compa - rar los colores con los patrones internos.

Determinación de los reactivos del área

1. Tetraclorofenoltetrabromosulfoftaleína (TTS)

Procedimiento:

Extraer 24 papeles indicadores de cada uno de los lotes, - depositandolos en vasos de precipitados de 50 ml, eluir 5 veces con una mezcla de amortiguador de fosfato/propanol-2 (Apéndice- B) con 5 ml cada vez, agitar durante 5 min a temperatura ambien - te.

Los eluatos recolectarlos en matraces volumétricos de 25 - ml y llevar hasta la marca con amortiguador de fosfato/propanol

2. Transferir 8 ml de esta solución a tubos de ensaye y centri-

fugar a 3000 r.p.m. por 5 min (Sol. problema). La extinción de los problemas medirla contra un blanco a 615 nm a 25°C.

Sol. blanco: centrifugar en tubos de ensaye 8 ml de la mezcla - amortiguador de fosfato/propanol-2, 5 min a 3000 r.p.m.

Cálculo

$$[ITS] = E_{615nm} \times 16.64 [\eta_{mol}/\text{área de prueba}]$$

2. Determinación del valor del pH

Procedimiento:

Extraer 120 papeles reactivos del sector (con pinzas) de cada uno de los lotes, depositandolos en tubos de ensaye; a cada tubo añadir 4 ml de agua destilada, agitar por 4 min, decantar las soluciones de extracción en tubos de ensaye más pequeños y medir el pH de cada lote a 25°C. con el potenciómetro ya calibrado.

SECTOR DE GLUCOSA

Reactivos del sector	Cl-APAC-Unidad/área
Glucosaoxidasa (GOD)	> 1.5
Peroxidasa (POD)	> 3.8
pH	5.3-5.7

Prueba de funcionamiento

Sumergir las tiras 1 seg en soluciones estandares de 30, - 100, 300 y 1000 mg de glucosa/100 ml de agua, eliminar el exceso sacudiendo la tira y después de 30 seg comparar los colores con los estandares internos.

Determinación de los reactivos del área

Procedimiento:

12 áreas del sector de glucosa de cada lote depositarlos - en vasos de 50 ml, agitar magnéticamente 5 min con 10 ml de --- amortiguador de fosfato 0.1M pH 5.03, 4 veces. Los eluatos recolectarlos en matraces volumétricos de 50 ml, aforar hasta la -- marca con el amortiguador de fosfatos 0.1M pH 5.03 (Sol. princ*ip*al).

Dos ml de la sol. principal de cada lote colocarlos en matraces volumétricos de 10 ml y aforar con el amortiguador de -- fosfatos 0.1M pH 5.03 (Dilución I).

1. Determinación de la actividad de la GOD

Pipetear en celdas los siguientes reactivos:						
Reactivo	Bl	Problemas				
		83156	82023	82945	81819	81670
Cl-APAC/amortiguador de PO ₄ / "saturado con Oxígeno"	3.00 ml	2.8 ml	2.8 ml	2.8 ml	2.8 ml	2.8 ml
Sol. de extracción (Dil. I)	-	0.01 ml	0.01 ml	0.01 ml	0.01 ml	0.01 ml
Sol. de PDD al 1 % *	0.01 ml	0.01 ml	0.01 ml	0.01 ml	0.01 ml	0.01 ml
Incubar a 25°C y añadir						
Sol. de glucosa*	0.10 ml	0.10 ml	0.10 ml	0.10 ml	0.10 ml	0.10 ml
Agitar las celdas y ajustar el aparato con el blanco, introducir los problemas y - tomar la primera lectura aproximadamente a los 5 min.; tomar otras 6 lecturas cada min. Longitud de onda 492 nm y temperatura de 25°C.						

* Ver apéndice B

Cálculo:

$$[GOD] = \Delta E/min \times 125.4 [Cl-APAC-Unidad/\text{área}]$$

2. Determinación de la actividad de la POD

Pipetear en celdas los siguientes reactivos:						
Reactivo	Bl	Problemas				
		83156	82023	82945	81819	81670
Sol. de Cl-APAC-Amortiguador de PO ₄ H ₂ O ₂ *	-	3.00 ml	3.00 ml	3.00 ml	3.00 ml	3.00 ml
Sol. principal	0.02 ml	0.02 ml	0.02 ml	0.02 ml	0.02 ml	0.02 ml

Mezclar y ajustar con el blanco el aparato a 492 nm y la temperatura de 25°C, introducir los problemas y tomar la primera lectura aproximadamente a los 5 min; tomar otras 6 lecturas - cada min.

* Ver apéndice B

Cálculo:

$$[POD] = \Delta E/\text{min.} \times 243.5 \quad [Cl-APAC-Unidad/\text{área}]$$

3. Determinación del valor del pH

Procedimiento:

Extraer 120 papeles del sector de cada uno de los lotes, depositandolos en tubos de ensaye, a estos añadir 4 ml de H₂O - destilada, agitar 3 min; las soluciones de extracción pasarlos a otros tubos y medir el pH en el potenciómetro ya calibrado.

SECTOR DE GETONAS

Reactivos del sector	
Glicina	> 20.35 μ mol/área
Nitroprusiato de sodio (NNP)	> 165 η mol/área
pH	9.1-9.3

Prueba de funcionamiento

Las tiras de los lotes se introduce en soluciones estanda-res de 0, 10, 50 y 250 mg % de ácido acetoacético (ver apéndice A) 1 seg, a los 60 seg comparar los colores obtenidos con patro-nes internos.

Determinación de los reactivos del sector

1. Determinación de la glicina

Procedimiento:

Depositar 9 papeles de cada lote en vasos de precipitados- de 50 ml, adicionar a cada uno 10 ml de H₂O destilada, agitar - magnéticamente 3 min; éste procedimiento repetirlo 4 veces. -- Transferir los eluatos a matraces volumétricos de 100 ml y afo-rrar a la marca. De estas últimas soluciones tomar 2.5 ml y depo-sitarlos en matraces volumétricos de 25 ml respectivamente para cada lote, aforar con agua destilada (sol. prueba)

Pipetear en matraces volumétricos de 10 ml.

Matraces Reactivo	Bl	Problemas					St
		83156	82023	82945	81819	81670	
H ₂ O destilada	1 ml	-	-	-	-	-	-
Sol. prueba	-	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	-
Sol. st. de glicina	-	-	-	-	-	-	1 ml
Amortiguador cianoacetato	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Ninhidrina 3%	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Mezclar e incubar 15 min en baño de agua en ebullición							
2-propanol 50%	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
Mezclar y reposar 10 min a temperatura ambiente, aforar con 2-propanol al 50 % las extinciones de los problemas y el estándar medirlos contra el blanco a 578 nm.							

Cálculo:

$$[\text{Glicina}] = \frac{E_{Pr}}{E_{St}} \times 24.8 \text{ } [\mu\text{mol}/\text{área de prueba}]$$

2..Determinación del nitroprusiato de sodio

Procedimiento

Colocar 24 áreas reactivas de los lotes en matraces volumétricos de 10 ml, los papeles eluirlos 3 veces con dimetilsulfóxido (DMSO); 2 veces con 3 ml y 1 vez con 4 ml, agitar 1 min, - tapar al terminar de agregar el DMSO. Las 3 extracciones (sol.-

prueba) depositarlas en matraces de 25 ml. Seguir el siguiente esquema.

Matraces Reactivo	B1	Problemas					St
		83156	82023	82945	81819	81670	
Sol. prueba	-	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	-
Sol st. de NNP	-	-	-	-	-	-	1 ml
DMSO	10 ml	-	-	-	-	-	9 ml
2-propanol	8 ml	8 ml	8 ml	8 ml	8 ml	8 ml	8 ml
Sulfuro de Na	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml

Aforar los matraces con 2-propanol, mezclar y dejar a 25°C - en baño de agua 4 min. Exactamente después de 5 min de la adición del sulfuro de Na, medir las extinciones de los problemas y el estandar contra el blanco a 546 nm.

Cálculo:

$$[NNP] = \frac{E_{Pr}}{E_{St}} \times W_{NNP} \times 3.36 \quad [\mu\text{mol}/\text{área de prueba}]$$

W_{NNP} = Peso del NNP en mg.

3. Determinación del valor del pH

Procedimiento

Extraer 46 papeles indicadores de cada lote, depositarlos en tubos de ensaye, a cada uno añadir 4 ml de H₂O destilada agitar por 2 min. Medir el pH de las soluciones de extracción.

SECTOR DE UROBILINOGENO

Reactivo del sector	η mol/área de prueba
4-metoxi-tetrafluoroborato	> 110

Prueba de funcionamiento

Introducir las tiras de los 5 lotes durante 1 seg en la serie de diluciones de 0, 1, 4, y 8 mg % de urobilinógeno (ver apéndice A), sacudirlas para eliminar el exceso de reactivo, a los 30 seg de reacción comparar los colores obtenidos con los patrones internos.

Determinación del reactivo del sector

4-metoxi-tetrafluoroborato

Procedimiento:

Depositar 24 áreas en vasos de precipitados de 50 ml, añadir 20 ml de amortiguador de citrato/HCl pH 3.02 (ver apéndice B), agitar por 3 min. Realizar esta operación 3 veces más; recolectar los eluatos en matraces volumétricos de 100 ml con el amortiguador (sol. de elución).

Colocar 15 ml de la solución de elución en un matraz volumétrico de 50 ml, añadir 20 ml de reactivo de acoplamiento (ver apéndice B) y aforarlos con agua destilada; incubar por 6 min a

25°C. Leer contra el blanco los problemas a 578nm.

Blanco: en un matraz volumétrico de 50 ml colocar 20 ml del --
reactivo de acoplamiento y aforar con amortiguador de citrato -
HCl e incubar a 25°C durante 7 min.

Cálculo:

$$[4\text{-metoxibenzol}] = E_{578\text{nm}} \times 420 [\eta_{\text{mol-área de prueba}}]$$

SECTOR DE BILIRRUBINA

Reactivos del sector	η mol/área de prueba
2,6-diclorobenzoldiazonio-tetrafluoroborato	> 23.0

Prueba de funcionamiento

Las tiras de los lotes se introducen en soluciones de 0, - 0.5, 1.0 y 5.0 mg de bilirrubina/100 ml de agua (Apéndice A) - durante 1 seg, eliminar el exceso; 30 seg después comparar los colores obtenidos con los patrones internos.

Determinación del reactivo del área

1. 2,6-diclorobenzoldiazonio-tetrafluoroborato

Procedimiento:

Depositar en vasos de precipitados de 50 ml (previamente - cubiertos de la luz con papel aluminio) 24 papeles reactivos de cada lote, añadir 8 ml de HCl 0.1M agitar 3 min, repetir esta- operación 3 veces más. Pasar los eluatos a matraces volumétri - cos de 50 ml (protegidos de la luz), añadir 20 ml de reactivo - de acoplamiento (Apendice B) mezclar y aforar con HCl 0.1M incu - bar a 21°C en baño de agua 5 min. La lectura de extinción se -- realiza a los 10 min a 492 nm.

Blanco: Agregar en un matraz aforado de 50 ml, 20 ml de HCl --
0.1M y 20 ml del reactivo de acoplamiento, aforar con HCl, re-
posar 8 min a 21°C.

Cálculo:

$$[2,6\text{-diclorobenzol}] = \epsilon_{492 \text{ nm}} \times 67.6 [\mu\text{mol/área de prueba}]$$

SECTOR DE SANGRE

Reactivos del sector	mol/área de prueba
Tetrametilbencidina (TMB)	> 79
2,5-dimetil-2,5-dihidroperoxihexano (DHHP)	> 0.60
pH	5.3-5.5

Pruebas de funcionamiento

Se introducen durante 1 seg las tiras de los 5 lotes en las soluciones de 0,10,50 y 250 eritrocitos/ μ l (ver apéndice A) sacudirlas para eliminar el exceso de reactivo y a los 30 seg - comparar los colores obtenidos con los patrones internos para eritrocitos intactos.

Introducir otras tiras en soluciones estandares de 50 y - 250 eritrocitos lisados/ μ l (ver apéndice A), las que corresponden a la hemoglobina de 50 y 250 eritrocitos/ μ l, durante 1 seg, a los 30 seg comparar con los colores patrones internos.

Determinación de reactivos del sector

1. Tetrametilbencidina (TMB)

Procedimiento:

Extraer 2/4 papeles reactivos respectivamente de los diferentes lotes, depositandose en matraces volumétricos de 50 ml,

agregar 40 ml de etanol, agitar 15 min y aforar con metanol (sol prueba).

Colocar en matraces volumétricos de 50 ml los sig. reactivos								
Matraces Reactivo	Problemas					E _{PL}	St	E _{RL}
	83156	82023	82945	81819	81670			
Sol prueba	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	-	-
Sol st. de TMB	-	-	-	-	-	-	1 ml	-
DABA*	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml

Aforar los matraces con etanol, reposar 10 min e incubar a 25°C en baño de agua, leer las extinciones a 436 nm.

* Ver apéndice B

Cálculo

$$[\text{TMB}] = \frac{E_{Pr} - E_{RL} - E_{PL}}{E_{St} - E_{RL}} \times E_w \times 2.6 \quad [\mu\text{mol/área de prueba}]$$

E_{RL} = Blanco reactivo

E_{PL} = Blanco papel

E_w = Peso del estandar de TMB en mg.

2. 2,5-dimetil-2,5-dihidroperoxi-hexano (DHHP)

Procedimiento:

Colocar 24 papeles indicadores en matraces volumétricos de 50 ml, añadir 25 ml de HCl al 25 % y 2 ml de ácido hexaclorotán (Apéndice B), agitar los 5 matraces durante 15 min, aforar-

con HCl, filtrar y leer las extinciones contra el blanco de HCl al 25 % a 405 nm.

Cálculo:

$$[\text{DHHP}] = E_{405 \text{ nm}} \times 1.80 \text{ } [\eta\text{mol/área de prueba}]$$

3. Determinación del valor del pH

Procedimiento:

En tubos de ensaye colocar 120 papeles reactivos de los 5-lotes; añadir a cada tubo 4 ml de agua destilada agitando por 4 min, decantar la solución de extracción en otros tubos y medir el pH de cada lote en un potenciómetro ya calibrado.

AREA DE NITRITOS

Lote	Tiempo (meses)	Prueba de funcionamiento		Reactivos	
		Nitritos [mg/100 ml]		THBCH μMol/área	Sulfanilamida μMol/área
		Colores patrón			
		0	0.05		
83156	6	correcto	correcto	64.26 ⁺	66.86 ⁺
82945	11	correcto	correcto	67.68 ⁺	70.87 ⁺
82023	17	correcto	correcto	74.29 ⁺	65.44 ⁺
81819	28	correcto	correcto	81.79 ⁺	78.01 ⁺
81670	39	correcto	correcto	78.22 ⁺	73.44 ⁺

THBCH = 3-hidroxí-1,2,3,4-tetrahidrobenzoquinolina

+ Valor correcto

CAPITULO IV
RESULTADOS

AREA DE pH

Lote	Tiempo (meses)	Prueba de funcionamiento					Reactivos	
		unidades de pH					Rojo de metilo ηMol/área	Azul de bromotimol ηMol/área
		Colores patrón						
		5	6	7	8	9		
83156	6	correcto	correcto	correcto	correcto	correcto	2.07 ⁺	11.79 ⁺
82023	11	correcto	correcto	correcto	correcto	correcto	1.19 ⁺	10.26 ⁺
82945	17	correcto	correcto	correcto	correcto	correcto	2.12 ⁺	11.59 ⁺
81819	28	correcto	correcto	correcto	correcto	correcto	2.12 ⁺	12.05 ⁺
81670	39	correcto	correcto	correcto	correcto	correcto	2.12 ⁺	11.88 ⁺

+ Valor correcto

AREA DE PROTEINAS

Lote	Tiempo (meses)	Prueba de funcionamiento				Reactivos	
		albúmina [mg/100 ml]				Tetracloro fenol ηMol/área	pH
		Colores patrón					
		0	30	100	500		
83156	6	correcto	correcto	correcto	correcto	6.87 ⁺	3.71 ⁺
82023	11	correcto	correcto	correcto	correcto	7.23 ⁺	3.65 ⁺
82945	17	correcto	correcto	correcto	correcto	7.33 ⁺	3.65 ⁺
81819	28	correcto	correcto	correcto	correcto	7.57 ⁺	3.65 ⁺
81670	39	correcto	correcto	correcto	correcto	7.98 ⁺	3.67 ⁺

+ Valor correcto

AREA DE GLUCOSA

Lote	Tiempo (meses)	Prueba de funcionamiento				Reactivos		
		glucosa [mg/100 ml]				Actividad de GOD U/área	Actividad de P00 U/área	pH
		Colores patrón						
		30	100	300	1000			
83156	6	correcto	correcto	correcto	correcto	1.50 ⁺	4.09 ⁺	5.45 ⁺
82945	11	correcto	correcto	correcto	correcto	1.69 ⁺	3.04 ⁺	5.46 ⁺
82023	17	correcto	correcto	correcto	correcto	1.57 ⁺	1.91 ⁺⁺	5.46 ⁺
81819	28	correcto	correcto	correcto	correcto	1.57 ⁺	4.01 ⁺	5.45 ⁺
81670	39	correcto	correcto	correcto	correcto	1.06 ⁺⁺	2.55 ⁺⁺	5.41 ⁺

+ Valor correcto

++ Valor incorrecto

AREA DE CUERPOS CETONICOS

Lote	Tiempo (meses)	Prueba de funcionamiento				Reactivos		
		ácido acetoacético [mg/100 ml]				Nitropru- sisto μMol/área	Glicina μMol/área	pH
		Colores patrón						
		0	10	50 	250 			
83156	6	correcto	correcto	correcto	correcto	101.15 ⁺	23.81 ⁺	9.19 ⁺
82023	11	correcto	correcto	correcto	correcto	254.5 ⁺	27.56 ⁺	9.19 ⁺
82945	17	correcto	correcto	correcto	correcto	231.11 ⁺	29.18 ⁺	9.20 ⁺
81819	28	correcto	correcto	correcto	correcto	228.4 ⁺	28.77 ⁺	9.19 ⁺
81670	39	correcto	correcto	correcto	correcto	249.3 ⁺	26.29 ⁺	9.19 ⁺

+ Valor correcto

AREA DE UROBILINUGENO

Lote	Tiempo (meses)	Prueba de funcionamiento					Reactivo 4-Metoxi- benzol. ηMol/Área
		urobilinógeno [mg %]					
		Colores patrón					
		0	1	4	8	12	
83156	6	incorrecto	correcto	correcto	correcto	correcto	142.38 ⁺
82023	11	incorrecto	correcto	correcto	correcto	correcto	146.58 ⁺
82945	17	incorrecto	correcto	correcto	correcto	correcto	150.36 ⁺
81819	28	incorrecto	correcto	correcto	correcto	correcto	142.80 ⁺
81670	39	incorrecto	correcto	correcto	correcto	correcto	148.68 ⁺

+ Valor correcto

AREA DE BILIRRUBINA

Lote	Tiempo (meses)	Prueba de funcionamiento				Reactivo 2,6-dicloro- benzoldiazoniou ηMol/área
		bilirrubina [mg/100 ml]				
		Colores patrón				
		0	0.5	1.0	5.0	
83156	6	correcto	correcto	correcto	incorrecto	24.23 ⁺
82023	11	correcto	correcto	correcto	incorrecto	17.03 ⁺⁺
82945	17	correcto	correcto	correcto	correcto	23.69 ⁺
81819	28	correcto	correcto	incorrecto	incorrecto	21.09 ⁺⁺
81670	39	correcto	correcto	correcto	incorrecto	22.91 ⁺⁺

+ Valor correcto

++ Valor incorrecto

AREA DE SANGRE

Lote	Tiempo (meses)	Pruebas de funcionamiento				Reactivos				
		Eritrocitos y hemoglobina erit/ μ l.						DHHP μ Mol/área	Tetrametil bencidina μ Mol/área	pH
		Colores patrón				Eri.	Hb.			
		0	10	50	250					
83156	6	correcto	correcto	correcto	correcto			0.765 ⁺	114.19 ⁺	5.33 ⁺
				correcto	correcto					
82023	11	correcto	correcto	correcto	correcto			0.736 ⁺	110.03 ⁺	5.32 ⁺
				correcto	correcto					
82945	17	correcto	correcto	correcto	correcto			0.684 ⁺	110.86 ⁺	5.28 ⁺⁺
				correcto	correcto					
81819	28	correcto	correcto	correcto	correcto			0.827 ⁺	101.34 ⁺	5.29 ⁺⁺
				correcto	correcto					
81670	39	correcto	incorrecto	correcto	correcto			0.642 ⁺	111.51 ⁺	5.28 ⁺⁺
				incorrecto	incorrecto					

DHHP = 2,5-dimetil-2,5-dihidroperoxihexano

+ Valor correcto

++ Valor incorrecto

CAPITULO V
ANÁLISIS DE RESULTADOS Y
CONCLUSIONES

Análisis de resultados

Este trabajo pretende dar a conocer la composición de las tiras reactivas comerciales y su estabilidad en cuanto a su tiempo de almacenamiento, ya que el Químico que ejerce su profesión dentro del Sector Salud se enfrenta a la diaria tarea de realización de múltiples exámenes de orina siendo importante que conozca el funcionamiento de las mismas. Las tiras reactivas proporcionan resultados semicuantitativos y cuando se obtenga algún resultado dudoso, se debe realizar la prueba por métodos cuantitativos. En este trabajo se ha observado que:

- Los sectores de nitritos, pH, proteínas, cuerpos cetónicos y urobilinógeno continúan funcionando a los 39 meses, aunque en la etiqueta se indica una estabilidad de 24 meses.
- El sector de glucosa ha disminuido su sensibilidad a los 39 meses debido a que las enzimas GOD y POD han disminuido su actividad, pero es estable por lo menos hasta su fecha de caducidad (24 meses).

- Es importante hacer notar que a la concentración de -
0 mg/dl el color obtenido para urobilinógeno es diferen-
te al color del patrón, debido a que en la orina siempre
se encuentra una pequeña concentración.

Conclusiones

En base a los resultados obtenidos tenemos que:

1. Las cetonas y sangre no son los sectores más inestables.
El sector de cetonas se puede utilizar a los 39 meses y
el de sangre hasta los 28 meses.
2. El sector de cetonas si es sensible a la humedad, por -
lo que se deben sacar el número de tiras que se van a
utilizar y cerrar el envase de las tiras inmediatamente,
como lo indica el fabricante.
3. El sector más inestable es el de bilirrubina, el cuál-
no funciona a los 28 meses y se recomienda no utilizar-
lo ya transcurrido este tiempo.
4. El sector de nitritos presenta un ligero deterioro fisi-
co a los 39 meses, pero no se ve afectada la sensibili-
dad del sector.
5. Se pueden seguir utilizando los sectores de nitritos, -
pH y proteínas 15 meses después de su fecha de caduci -
dad.

6. El sector de glucosa es hipersensible a soluciones acusas pero esta disminuye en orina.

Así mismo cabe enfatizar que las determinaciones realizadas para el establecimiento del tiempo de deterioro de las tiras, fueron realizadas a temperatura ambiente, por lo que se recomienda para posteriores trabajos el análisis de un solo lote a diferentes temperaturas.

C A P I T U L O I V

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Angaran D.M., Smith D.F. and Birnbaum M.L. USE OF CLINI --
TEST URINE TEST FOR INDIRECT ESTIMATION OF BLOOD GLUCOSA LE
VELS IN THE CRITICALLY III. Am. J. Hosp. 37(7): 950-56 1980.
- 2.- Bagavan N.V., BIOQUIMICA, 1a. ed., Interamericana, México -
1978, p.p. 27,28, 534, 540, 543-46.
- 3.- Bennington J.L., Fouty R.A. y Haugie C. EL LABORATORIO EN -
EL DIAGNOSTICO CLINICO, La Prensa Médica Mexicana, México -
1976, p.p. 7, 9, 201, 591-94.
- 4.- Bojalil J., Santocay G., Rodriguez M., Sosa Martinez J. MI
CROBIOLOGIA MEDICA. Tomo I, Ed. Francisco Mendez Oteo; Méxi
co 1981, p.p. 449, 450, 471, 525, 543, 546, 548.
- 5.- Brandt R., Guyer Kenneth E. and Banks William L. Jr., URI-
NARY GLUCOSE AND VITAMIN C. Am. J. Clin. Pathol. 68(5); --
592-94. 1979
- 6.- Brerenton D.M., Sontrop M.E..and Fraser C.G. TIMING OF URI-
NALYSIS REACTIONS WHEN REAGENTS STRIP ARE USED. Clin. Chem.
241(8); 1420-21 1978.
- 7.- Connors A. Kenneth. A TEXTBOOK OF PHARMACEUTICAL ANALYSIS -
2a. ed., Wiley & Sons, U.S.A. 1975, p.p. 31-33.

- 8.- Devidsohn I. y Henry B.J. DIAGNOSTICO CLINICO POR EL LABORATORIO, 6a. ed., Salvat editores. España 1981, p.p. 36, 44, 55, 56, 62, 63, 67, 70-73, 619, 800, 830.
- 9.- Davis B.D., Dulbecco R., Eisen H.N. Geisberg H.S. y Wood -- W.B. TRATADO DE MICROBIOLOGIA, 2a. ed., Salvat editores, España 1979, p.p. 50, 752, 978.
- 10.- Dyerberg J., Pedersen L. and Aagaard O. EVALUATION OF ADI- PSTICK TEST GLUCOSE IN URINE. Clin. Chem. 22(2): 205, 210- 1976.
- 11.- Guignard J.P. and Torrado A., NITRITE INDICATOR STRIP TEST FOR BACTERIURIA. Lancet vol. 1 p.p. 47. 1978
- 12.- Hearne C.R., Donnell M.G. and Fraser C.G. ASSEMENT OF NEW- URINALISIS DIPSTICK. Clin. Chem. 26(1): 170-71. 1980
- 13.- Hyman Harold Thomas. DIFFERENTIAL DIAGNOSIS. 2a. ed. J.B.-- Lippincott Company, U.S.A. 1965 p.p. 185.
- 14.- Iovine, et al. EL LABORATORIO EN LA CLINICA. 2a. ed. Pana- mericana. Argentina 1979, p.p. 737, 725.
- 15.- James G.P., Bee D.E. and Fuller J.B. ACCURACY AND PRECI - SION OF URINARY pH DETERMINATION USING TWO COMMERCIALY - AVAILABLE DIPSTICKS. Am. J. Clin. Pathol. 70(3): 364-74.-- 1978.
- 16.- Karam J.H. and Myers L.R. REAGENT STRIP FAILURE. JAMA - 242(6): 514, 1979.

- 17.- Kolmer J.A. DIAGNOSTICO CLINICO POR LOS ANALISIS DE LABORATORIO 3a. ed., Interamericana, México 1963, p.p. 44, 45, 46, 51, 59.
- 18.- Kutter Dolphe. TEST RAPIDOS EN EL DIAGNOSTICO CLINICO. 1a. ed. Ediciones Toray S.A. Alemania 1977, p.p. 9-26, 53, 66-71, 83- 110, 138-157, 233-237
- 19.- Lynch J.M., Raphael S.S., Mellor D.L., Spare D.P. e Inwood J.M. METODOS DE LABORATORIO, 2a. ed. Interamericana, México 1972, p.p. 105, 106, 107, 199, 208, 481.
- 20.- Mertz T. Edwin. BIOQUIMICA. 2a. reimpresión. Publicaciones Cultural S.A. México 1976 p.p. 270-71
- 21.- Rosebloom A.L. and Malone J.I. RECOGNITION OF IMPENDING - KETOACIDOSIS DELAYED BY KETONE REAGENT STRIP FAILURE. -- JAMA 240(22): 2462-464 1978.
- 22.- Scheifere D.W. and Smith A.L. HOME-TESTING FOR RECURRENT - BACTERIURIA USING NITRITE STRIPS. Am. J. Dis. Child. 132(1) 46-48. 1978.
- 23.- Simpson E. and Thompson D. ROUTINE URINALYSIS. Lancet vol. 2 p.p. 361-62. 1977.
- 24.- Sineniotis C.A., Haratsaris M.N. and Papadatos C.J. NITRITE INDICATORS STRIP TEST FOR BACTERIURIA. Lancet 1(8067) - 776-77. 1978.
- 25.- Smith B.C., Peake M.J. and Frazer C.G. URINALYSIS BY USE - OF MULTI-TEST REAGENT STRIP: TWO DIPSTICKS COMPARED. Clin.

Chem. 23(12): 2337-340. 1977.

- 26.- Sonnenwirth C.A. and Jarrett L. GRADWOHL'S CLINICAL LABORATORY METHODS AND DIAGNOSIS. 8a. ed., The C.V. Mosby Company. U.S.A. 1980, p.p. 478-91.
- 27.- Tietz W. Norbert, et al. FUNDAMENTALS OF CLINICAL CHEMISTRY. Saunders Company, U.S.A. 1982, p.p. 195-98, 359, 692, 712, 731, 776-80.
- 28.- White-Stevens R.H. INTERFERENCE BY ASCORBIC ACID IN TEST SYSTEMS INVOLVING PEROXIDASE I. REVERSIBLE INDICATORS AND THE EFFECTS OF COPPER, IRON, AND MERCURY. Clin. Chem. 28(4) 578-88. 1978.

APENDICE A

Reactivos para pruebas de Funcionamiento

Soluciones estandares de cetona

Para la preparación de las soluciones, preparar una solución madre de ácido acetoacético y determinar la concentración de la solución y de esta preparar diluciones.

1.- Preparación de la solución madre de ácido acetoacético:

Colocar 3 ml de ácido metil ester en un matraz volumétrico de 100 ml y llevar hasta la marca con NaOH 0.2N, dejar en refrigeración 3 días para hidrólisis.

2.- Determinación de la concentración de la solución madre de ácido acetoacético.

Dilución I: tomar 1 ml de la solución madre y aforar a 200 ml con agua destilada

Dilución II: 5 ml de la dilución I se aforan a 200 ml con amortiguador de fosfato de potasio pH 6.8. Incubar 10 min. a 25°C.

Pipetear en celdas los siguientes reactivos:	
Reactivos	Pr
Dilución II	2.0 ml
NADH-Na ₂	0.2 ml
Mezclar y medir la extinción (E ₁) a 366 nm contra aire. Añadir el siguiente reactivo	
3-hidroxi-butirato-deshidrogenasa (3-HBDH)	0.2 ml
Mezclar y cuando se haya detenido la reacción, que dura aproximadamente 25 min leer la extinción (E ₂)	

Cálculo:

$$C_A = (E_1 - E_2) \times 13.7 \times 10^3$$

$$C_A = (0.758 - 0.550) \times 13.7 \times 10^3$$

$$C_A = 2849.6 \text{ mg de ácido cetoacético/dl}$$

$$\frac{25000}{C_A} = \text{ml de la solución madre de ácido acetoacético, aforar a 100 ml (Sol. A)}$$

$$\frac{25000}{2849.6} = 8.7 \text{ ml de ácido acetoacético}$$

Sol. A = 8.7 ml de ácido acetoacético (sol. madre) aforar a 100 ml con amortiguador de fosfato pH 6.8

3.- Preparación de soluciones estandares de cetonas

Colocar en tubos de ensaye los siguientes reactivos			
cc. acetoacéti co mg %	Sol. A	Amortiguador de K_2HPO_4	Sol. de color*
0	0.0 ml	10.0 ml	0.10 ml
10	0.4 ml	9.6 ml	0.10 ml
50	2.0 ml	8.0 ml	0.10 ml
250	10.0 ml	0.0 ml	0.10 ml

* Color amarillo-anaranjado al 1%

Soluciones estandares de urobilinógeno

1.- Determinación de urobilinógeno de un lote

Solución de urobilinógeno; disolver 0.5 mg de urobilinógeno en 5 ml de etanol y aforar a 50 ml (tapar de la luz).

En un matraz de 25 ml añadir 1.25 ml de Sol. de urobilinógeno, 6.25 ml de 4-dimetilbenzaldehído y 2.5 ml de acetato de sodio, aforar y medir a 557 nm contra un blanco.

$$P = E_{Pr} - E_{Bl} \times 182.5 = \% \text{ de urobilinógeno en mg.}$$

$$P = 0.211 - 0.024 \times 182.5 = 34.1275 \% \text{ de urobilinógeno que contiene el lote.}$$

$$\frac{1000}{P} = \text{mg de urobilinógeno que se deben pesar del lote que se le determinó el contenido de urobilinógeno.}$$

$$\frac{1000}{34.1275} = 29.3018 \text{ mg de urobilinógeno para pesar del lote.}$$

- 2.- Preparación de la sol. principal de urobilinógeno: pesar - 30.0 mg de urobilinógeno en un matraz amber de 50 ml, disolver con 25 gotas de NaOH 0.1N con ayuda de un agitador-magnético, aforar con agua destilada
- 3.- Preparación de soluciones de prueba de urobilinógeno

Pipetear en tubos de ensaye los siguientes reactivos:		
urobilinógeno	Sol. principal	Agua destilada
0 mg/100 ml	0.0 ml	10.0 ml
2 mg/100ml	1.0 ml	9.0 ml
4 mg/100 ml	2.0 ml	8.0 ml
8 mg/100 ml	4.0 ml	6.0 ml
12 mg/100 ml	6.0 ml	4.0 ml

Soluciones estandares de bilirrubina

- 1.- Preparación de la solución madre de bilirrubina: en un matraz amber de 100 ml pesar 10 mg de bilirrubina, agregar 2 ml de NaOH 0.05N, agitar hasta disolución de la bilirrubina en seguida agregar 2 ml de Luviskol al 3%, agitar y aforar-amortiguador de fosfatos pH 8 (sol. madre).

2.- Determinación de la concentración de bilirrubina de la solución madre.

Diluir la bilirrubina 1:1

Pipetear en tubos de ensaye		
Reactivo	Sl	Pr
ácido sulfanílico	0.2 ml	0.2 ml
Nitrito de sodio	-	1 gota
Benzoato de cafeína	1.0 ml	1.0 ml
Bilirrubina (dil. 1:1)	0.2 ml	0.2 ml
Mezclar y reposar 15 min		
Tartrato	1.0 ml	1.0 ml
Mezclar y reposar 5 min y leer el problema contra el 81 a 578 nm y 25°C.		

3.- Preparación de las soluciones estandares de bilirrubina

Sol. cero de bilirrubina: colocar 2 ml de NaOH 0.05N y 2 ml de Luviskol al 3 %, mezclar y aforar a 100 ml con amortiguador de fosfato pH 8.

bilirrubina	sol. cero de bilirrubina	sol. madre de bilirrubina
0.0 mg/dl	10.00 ml	-
0.5 mg/dl	9.01 ml	0.5 ml
1.0 mg/dl	8.06 ml	1.0 ml
5.0 mg/dl	4.06 ml	5.0 ml

Soluciones estandares de sangre

- 1.- Solución madre de sangre: en un matraz volumétrico de 25 ml llenarlo hasta la mitad con agua destilada y añadir 50 μ l - de un estandar de sangre, aforar con agua destilada. De esta solución colocar 5 ml en un matraz de 50 ml y llevar -- hasta la marca (sol. A).
- 2.- Preparación de soluciones estandares de sangre

En vasos de precipitados de 25 ml añadir		
Eritrocitos/ μ l	Agua destilada	Sol. A
0	20.0 ml	-
10	19.8 ml	0.2 ml
50	19.0 ml	1.0 ml
250	15.0 ml	5.0 ml

- 3.- Soluciones estandares de hemoglobina: preparar las 2 últimas diluciones de los estandares de sangre (50 y 250 eritrocitos/ μ l) y a cada una agregar trazas de saponina y agitarlos.

APENDICE B

Reactivos para determinación de las áreas reactivas

Reactivos para el sector de nitritos

- 1.- Sol. de sulfanilamida
 - 0.0130 g de sulfanilamida
 - 15.1 mg de THCHaforar a 100 ml con etanol

- 2.- Sol. reactiva
 - 75.1 mg de THCH
 - 10 ml de etanolmezclar y aforar con agua destilada a 25 ml.

Reactivos para el sector de proteínas

- 1.- Amortiguador de fosfato de potasio pH 7.0/propanol-2 1:1
 - 100 ml. de amortiguador de fosfato de potasio pH 7.0 0.1M
 - 100 ml. de propanol-2

Reactivos para el sector de glucosa

- 1.- Sol. de Cl-APAC/amortiguador de fosfato de potasio 0.1M
 - Disolver con 100 ml de amortiguador de fosfato de potasio - 0.1M pH 5.0, 0.1872 g de Cl-APAC (sol. A)
 - De la sol. anterior de Cl-APAC tomar 30 ml. en un matraz de 100 ml. y aforar con el amortiguador (sol. B).

- 2.- Cl-APAC/amortiguador de fosfato de potasio "saturada con O_2 "
Una pequeña cantidad de sol. B colocarla en un vaso y agitar magnéticamente por 10 min para su saturación con O_2 .
- 3.- Sol. de glucosa
Disolver con 2.5 ml de agua destilada 1.25 g de monohidrato de glucosa.
- 4.- Sol. de Cl-APAC/amortiguador de fosfato de potasio/ H_2O_2
- 7.5 ml de sol. A
- 3.75 ml de H_2O_2
aforar a 25 ml. con amortiguador de fosfato pH 5.0 0.1M
- 5.- Sol. de H_2O_2
Colocar 0.1 ml de perhidrol al 30% en un matraz de 100 ml y llevar hasta la marca con agua destilada.

Reactivos para el sector de cetonas

- 1.- Sol. estandar de glicina $2 \times 10^{-4} M$
Disolver 0.0375 g de glicina con agua destilada y aforar a 25 ml. con agua destilada. De esta solución tomar 2 ml. y aforarlos a 200 ml con agua destilada.
- 2.- Amortiguador de cianoacetato
- 1 ml de NaCN 0.01M y aforar a 50 ml con amortiguador de acetato 2M.
- 3.- Sol. de ninhidrina al 3% (w/v)
Disolver 750 mg de ninhidrina con etilenglicol y aforar a -

25 ml con el etilenglicolmonometileter.

4.- Propanol-2 al 50% (v/v)

- 25 ml de 2-propanol
- 25 ml de agua destilada

5.- Sol. estandar de NNP 0.05M

Disolver 37.6 mg de nitroprusiato de sodio con DMSO y aforar con este a 50 ml.

6.- Sulfuro de sodio

Disolver 3.0754 g de Na_2S con agua destilada y aforar a 50 ml.

Reactivos para el sector de urobilinógeno

1.- Amortiguador de citrato/HCl

Disolver con 100 ml de NaOH 10.52 g de ácido cítrico y aforar a 500 ml con agua destilada. A 400 ml de esta solución- medir el pH (4.90), se adiciona 550 ml de HCl 0.1M para ajustar el pH a 3.0

2.- Reactivo de acoplamiento

Disolver 856.1 mg de THBCH con metanol y aforar a 200 ml.

Reactivo para el sector bilirribina

1.- Reactivo de acoplamiento

Disolver 32 mg de THBCH con 160 ml de metanol.

Reactivos para el sector de sangre

1.- Sol. detetrametilbencidina (TMB)

7.5 mg de TMB disolver y aforar con metanol a 50 ml.

2.- Reactivo de dimetilaminobenzaldehído al 5% en ácido sulfúrico diluido (REACTIVO DABA)

- 5 g de dimetilaminobenzaldehído

- 50 ml de ácido sulfúrico 2.5M

Disolver el dimetilaminobenzaldehído con el ácido y aforar a 100 ml con agua destilada.

3.- Acido hexaclorotitán

A 40 ml de Titán-IV-cloruro adicionar lentamente HCl concentrado, una vez disuelto aforar con el mismo a 200 ml.