

35
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales "Zaragoza"

DESARROLLO DE MICROTECNOLOGIA PARA LA QUIMICA SANGUINEA RUTINARIA EN EL LABORATORIO CLINICO

T E S I S

**Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P r e s e n t a :
Aurelia Patricia Ocampo Téllez**

México, D. F. Septiembre de 1990



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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

	pag.
I INTRODUCCION	1
II ANTECEDENTES	6
III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
IV OBJETIVOS	17
V HIPOTESIS DE TRABAJO	18
VI MATERIAL	19
VII METODOS	21
VIII RESULTADOS	24
IX DISCUSION DE RESULTADOS	27
X CONCLUSIONES	42
XI RECOMENDACIONES	43
XII BIBLIOGRAFIA	44

**DESARROLLO DE MICROTECNOLOGIA PARA LA QUIMICA SANGUINEA
RUTINARIA EN EL LABORATORIO CLINICO**

I INTRODUCCION

I. INTRODUCCION.

La Química Clínica es una ciencia que puede considerarse joven, ya que ha principios de siglo, por ejemplo, no se tenían técnicas para dosificar glucosa en sangre.

Hasta el inicio de los años veinte, gracias a los trabajos de Folin-Wu, fue posible la cuantificación de metabolitos en sangre y orina.

A pesar de ser una ciencia con tan poco tiempo de inicio, el avance y evolución de la Química Clínica han sido asombrosos. Por ejemplo antes era clásico llevar a cabo toda una marcha analítica para cualquier determinación.

Había que preparar un filtrado libre de proteínas para el cual se usaban dos reactivos, después para cada elemento que se quería determinar se volvían a usar dos ó tres reactivos, actualmente las técnicas han evolucionado y se ha llegado a tener una especificidad y exactitud muy grandes sin necesidad de recurrir a la preparación de filtrados libres de proteínas.

La mayoría de las técnicas actuales tienden simplemente a poner la muestra (suero, plasma, etc.) en contacto con un reactivo específico para lograr la determinación del parámetro deseado, esto ha facilitado la automatización o semiautomatización de la tecnología clínica y si antes se necesitaban mililitros de sangre total para trabajar una "química sanguínea", actualmente las mismas determinaciones se logran con volúmenes mínimos de muestra y por lo tanto pequeñas cantidades de reactivo (1).

Las primeras microtécnicas en Química Clínica fueron originadas como respuesta a las necesidades pediátricas, debido a las pequeñas cantidades de sangre en recién nacidos y prematuros. Natelson menciona que 5 mililitros de plasma representan cerca del 10% de plasma total de un prematuro de un kilogramo (1).

Natelson, Sanz y otros hicieron contribuciones importantes para el desarrollo de procedimientos de Química Clínica adecuados a las necesidades pediátricas, requiriendo 50 microlitros o menos de plasma o suero por determinación.

La mayoría de las determinaciones comunes en el laboratorio pueden actualmente ser procesadas con muestras ultramicro (de 1 a 50 microlitros).

Las microtécnicas tienen la ventaja de hacer durar la muestra, los reactivos, reducir espacio y frecuentemente tiempo. Por estas razones son también convenientes para análisis de adultos. Si se emplean apropiadamente las microtécnicas no son inferiores a los procedimientos macro con respecto a exactitud y precisión y pueden ser mejores especialmente si son automatizadas (21).

La confiabilidad y fácil manejo de espectrofotómetros automáticos y

semiautomáticos para técnicas micro han llevado a un amplio desarrollo de dichos instrumentos en los últimos años ya que decididamente contribuirán al extendimiento de la microtécnicas en Química Clínica.

El uso de volúmenes tan pequeños ha llevado al desarrollo de nueva tecnología para la medida de muestra y reactivo, demostrando que el uso de pipetas graduadas, volumétricas, es obsoleto. Se ha tenido la necesidad de desarrollar pipetas automáticas, dilutores, medidores de volumen constante que permitan trabajar la micromuestra adecuadamente (21).

Como ya se mencionó, las alícuotas en microlitros de muestra y reactivo al medirse y transferirse para un proceso posterior deben trabajarse con buenas pipetas que proporcionen reproducibilidad, exactitud y facilidad de operación.

A nivel de microtécnicas la exactitud volumétrica absoluta es difícil de realizar, por ejemplo se usan pipetas de vidrio de tipo de "lavado" para eliminar el error debido al líquido adherente remanente en la pipeta. Las pipetas de polietileno calibradas para "entregar" deben ser repelentes al agua para dar buenos resultados. Sin embargo se reconoce que la exactitud absoluta no es necesaria si ambas, muestras y patrones son medidos con la misma pipeta (21).

Se ha visto que la evolución de los espectrofotómetros desde los que poseían galvanómetros de aguja y espejo hasta los que proporcionan lectura digital que permiten lecturas con gran exactitud con variaciones de una milésima de absorbancia, tienen un control electrónico de temperatura en las celdas de reacción, las cuales ya no tienen un volumen total de 3 ó más mililitros, sino que el volumen total de la celda es de 0.3 a 0.5 ml.

Impresoras y calculadoras han sido también integradas a equipos accesibles para la mayoría de los laboratorios (20).

Puede decirse que en México el uso de esta nueva tecnología es aún limitada, todavía se requieren varios mililitros de muestra en muchos laboratorios, incluyendo los oficiales, como es lógico al usar estas cantidades de muestra se ven en la necesidad de hacer punción venosa contra la punción capilar que evitaría muchas molestias al paciente y reduciría costos de toma de muestra.

Aunque en este trabajo se presentarán técnicas "manuales" como información se explica que en cuanto a análisis automático existen esencialmente dos tipos básicos: el sistema de flujo continuo y el de muestreo discreto.

En el sistema de flujo continuo las muestras se siguen una a otra en secuencia a través de un canal. En análisis discreto, cada muestra ocupa un recipiente separado y los recipientes son analizados en paralelo o en secuencia (20).

Se hace una comparación de trabajo en cuanto a técnicas manuales y

automáticas (20).

Pasos manuales.	Automatización.
Pipetear muestras y reactivos.	Muestreador, pipeteador, bombas.
Mezclar.	Mezclador mecánico o burbujas de aire.
Desproteínización	Dializador, columnas de resina.
Calentar e incubar.	Baños.
Tiempo de desarrollo.	Serpentines transportadores.
Medida de la muestra.	La muestra fluye a través del espectrofotómetro.
Leer y calcular,	Registrador, impresora, computadora.

Por lo anterior se observan las siguientes ventajas de la automatización:

- 1.-Un número grande de muestras pueden procesarse con mínimo tiempo para cada técnica.
- 2.-Se realizan dos o más métodos simultáneamente.
- 3.-La precisión es superior a la ejecución manual.
- 4.-No se necesitan cálculos.

Pero también ya en la práctica se encuentran varias desventajas en la automatización y son:

- 1.-Limitaciones en el tipo de metodología que puede ser usada.
- 2.-La naturaleza automática de estos instrumentos disuade a los técnicos de considerar a discreción problemas potenciales.
- 3.-Los instrumentos son uniformemente objetivos, así que no pueden ejercitar el juicio esperado de un técnico experimentado en el caso de una turbidez potencialmente interferente o un color falso, por ejemplo lo cual puede estar relacionado a una muestra dada o a un grupo completo de pruebas.
- 4.-Muchos sistemas son imprácticos para usarse con un número pequeño de muestras. Por lo tanto los métodos manuales pueden requerirse para un examen individual de emergencia. Estos métodos deben también estar disponibles en el caso de fallas en el equipo.

5.-Los sistemas son muy caros para compra y mantenimiento. Los horarios regulares de mantenimiento técnico así como las visitas de personal de servicio entrenado son muy costosas.

6.-La relativa facilidad con que los sistemas automáticos producen resultados fomenta la acumulación de grandes cantidades de información irrelevante, la cual debe ser calculada, registrada y almacenada (20).

Al hacer la observación general de la metodología clínica se encuentra también que la necesidad de micrométodos tiene además otro estímulo, que es el de conocer los niveles de numerosos componentes de la sangre, para un buen diagnóstico y tratamiento de la enfermedad (1).

Al observar y entender las interrelaciones de varios componentes sanguíneos se comprendió que en algunos casos se necesita valorar todo un grupo de componentes para lograr una buena evaluación médica, ya que es claro que no se puede predecir con seguridad el nivel de cualquier constituyente particular de la sangre a partir del conocimiento de otro.

Un problema más que se observa es la toma de muestra, mencionada anteriormente como factor importante para la obtención de buenos resultados (3).

Microanálisis implica el ensayo de una muestra pequeña. No necesariamente equipo pequeño o micromedidas después de la de la muestra y no requiere usualmente equipo especial no encontrado en el laboratorio clínico.

Además de todo lo mencionado se observa que ciertos problemas de la técnica macro se resuelven con la micro, cuando muchos colores no diluidos no siguen la Ley de Lambert-Beer excepto en concentraciones diluidas; también son requeridas cantidades ultramicro para la exactitud de los análisis con los métodos de fluorescencia que frecuentemente requieren concentraciones de 0.2 mcg/ml o menos, las concentraciones mayores causarán problemas.

Un ejemplo de macro y micro es el siguiente: si se digieren 0.01 ml de sangre y se usa 0.1 ml de ácido sulfúrico y 0.1 ml de ácido perclórico, esto es equivalente a usar 1.0 ml de sangre más 10 ml de cada ácido, lo que hace pensar que el macrométodo ofrece peligro de explosión y esto es impráctico, sin embargo cantidades más pequeñas de cada ácido se usan en el macrométodo. Así un procedimiento de digestión que toma minutos en la técnica micro es un procedimiento mucho más lento en la versión práctica macro (1).

Ciertos procedimientos requieren concentraciones ultramicro antes de dar resultados cuantitativos. Un ejemplo es la fotometría de flama, si las soluciones que contienen sodio o potasio se usan en concentraciones de más de 50 mcg/ml, la flama pronto se saturará y

las diferencias de concentración no podrán ser determinadas exactamente.

Para sodio se tenía que diluir el suero 1:200, en macro 1 ml a 200 ml, en micro 0.1 ml a 20 ml u ultramicro 0.025 a 5 ml.

Algunos puntos básicos para el microanálisis son:

1.-Ajustar volúmenes y concentraciones de reactivos para que el orden de la medida final permanezca igual con la microcantidad.

2.-Escoger un procedimiento que minimice transferencias y disminuya el número de reactivos.

3.-Cuando sea práctico escoger un método que mida la sustancia a ser probada como un patrón, que la mida directamente y no a través de uno de sus derivados.

4.-Usar ultramicropipetas de lavado calibradas para contener la muestra.

5.-Para titulaciones emplear indicadores sensibles de punto final, usar buretas ultramicro.

6.-Para colorimetría se prefiere un procedimiento que desarrolle un color estable de alta absorción y que siga la Ley de Beer sobre el rango a ser determinado (1).

A continuación se presenta la clasificación de los métodos en términos de volumen de muestra, según varios autores:

Clasificación de Todd-Sanford (2):

Macro métodos	1 ml o más.
Micro métodos	0.1 ml a 0.9 ml.
Ultramicro métodos o Métodos de microlitros	0.09 ml a 0.01 ml.
Métodos de nanolitros	0.009 ml a 0.001 ml.

Para Richard Henry 0.1 ml a 0.5 ml es semimicro y de 100 mcl o menos es microtécnica (4).

Meites (22) reporta que hasta 25 mcl es microtécnica y según Mattenheimer (23) hasta 10 mcl es microtécnica y volúmenes menores son incluidos en las técnicas ultramicro.

II ANTECEDENTES

II.-ANTECEDENTES.

II.1.-Metabolitos.

II.1.1.-Glucosa. Los hidratos de carbono y sus derivados son polihidroxialdehidos y/o polihidroxicetonas. Una sola unidad de estos compuestos es llamada monosacárido, el más abundante e importante de estos es la D-glucosa, tiene seis átomos de carbono y es el combustible principal para la mayor parte de organismos y es también la unidad estructural básica de los polisacáridos más abundantes.

La D-glucosa es una aldohexosa porque posee un grupo carbonilo al final de la cadena (derivado aldehídico) (8). Los monosacáridos se absorben en el intestino, pasan a torrente sanguíneo y viajan hasta el hígado (2).

La glucosa es el único azúcar presente en sangre ya que la fructosa y galactosa son convertidas a glucosa en el hígado (2). Es transportada a todas las células del cuerpo a través del líquido extracelular e intersticial y proviene de tres fuentes: 1.- alimentos, 2.- precursores diferentes de carbohidratos convertidos a glucosa, 3.- glucogenólisis (5).

La importancia clínica de la cuantificación de la glucosa radica principalmente en la detección y control de la diabetes, enfermedad en la que existe la incapacidad de tomar energía partir de la glucosa debido a insuficiencia o carencia de insulina.

Las principales consecuencias de esta enfermedad ocurren a nivel circulatorio, renal, visual, etc. Ejemplo: cetoacidosis, retinopatía, neuropatía, nefropatía, arterosclerosis y también una mayor susceptibilidad a infecciones virales, bacterianas y micóticas (14).

La cuantificación de glucosa en sangre se inició con los trabajos de Folin-Wu, cuyo método se basaba en reaccionar la sangre con ácido tungstíco, después con una solución alcalina de cobre al 5% con la posterior adición de fosfomolibdato (25).

Este método tiene el inconveniente de ser inespecífico porque mide también otras sustancias reductoras como: glutatión, ácido glucurónico, ácido ascórbico y otras hexosas (2).

Otra versión de este método fue la técnica de Nelson-Somogyi, donde la glucosa presente en el filtrado de disulfato de zinc reduce el cobre en solución alcalina caliente y después este reduciría el arsenomolibdato produciendo un complejo azul. Este filtrado está virtualmente libre de otras sustancias reductoras (24).

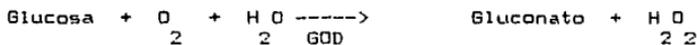
En 1959, Hultman (26) describe un método que posee también cierta inespecificidad, la glucosa se hace reaccionar en medio ácido caliente con Orto-toluidina formando un compuesto de color verde (probablemente glucosilamina) el cual se cuantifica fotométricamente a 630 nm (27).

Se han desarrollado también procedimientos automatizados como el de la reducción de ferrocianuro alcalino, donde los iones amarillos del ferrocianuro pasan a iones incoloros al reducir la glucosa a un pH alcalino (28). Existen a su vez otras versiones de técnicas automatizadas utilizando los principios de reducción del cobre por la glucosa (neocuproína) (18).

El método iodométrico de Somogyi que utilizaba sulfato de zinc e hidróxido de bario para precipitar las proteínas y donde la reducción del cobre en solución alcalina servía para la posterior reducción del yodo no fue usado, aunque se consideraba entre los más exactos, ya que consumía mucho tiempo para el análisis (24).

También se desarrolló un método enzimático para cuantificar glucosa, el fundamento estriba en que una enzima sólo reacciona con un sustrato haciendo a este método esencialmente específico.

Este factor y la rapidez del proceso, decidieron que se utilizara el método de la Glucosa-oxidasa en este trabajo. La reacción que se realiza es la siguiente:



ABTS= di-amonio, 2,2'.azino bis (3 etil benzotiazolina, 6-sulfonato) (12).

Los valores de referencia para glucosa con este método oscilan entre 70 y 110 mg/dl.

II.1.2.-Urea. La urea es el principal producto del catabolismo de las proteínas, se deriva de los grupos amino de los aminoácidos que las forman, es producida en el hígado a través del ciclo de la ornitina y es uno de los compuestos nitrogenados no proteicos junto con la creatinina, creatina, aminoácidos y ión amonio.

Otra forma de nombrar a este metabolito es como nitrógeno uréico en la sangre (NUS). La concentración del NUS es aproximadamente la mitad de la concentración de urea (2). El NUS depende de la producción de urea y su excreción, también depende de las variaciones en volumen de orina que a su vez dependen de la cantidad de líquidos ingeridos por el individuo (una ingestión acuosa mínima por individuos con ingesta proteica normal produce valores superiores extremos de los valores normales de NUS) (4).

Las elevaciones de nitrógeno de urea en enfermedad renal son de alguna forma más pronunciadas que las de creatinina, así se observa que con un valor normal de creatinina y NUS elevado puede hablarse de causas prerrenales (ejemplo: sangrado intestinal).

Por otra parte la retención de compuestos nitrogenados no protéicos debido a la obstrucción del tracto urinario causarán incrementos casi simultáneos y proporcionales en ambos niveles de nitrógeno de urea y creatinina. El NUS se encuentra aumentado en deshidratación, enfermedades gastrointestinales, excreción renal defectuosa por afecciones renales, catabolismo protéico excesivo y diabetes.

Los niveles bajos están asociados con el embarazo y daño hepático (3), (4).

Para su determinación han existido básicamente tres métodos:

- 1.-Nesslerización directa. 2.- Aereación 3.- Método colorimétrico con diacetilmonoxima.

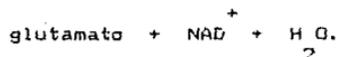
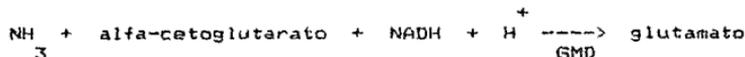
En el primer método la urea se convierte a carbonato de amonio por la acción de la enzima ureasa. Se mide el ión amonio por su conversión al adicionarle el reactivo de Nessler (doble ioduro de mercurio). La producción de color está en relación directa con la concentración de amoníaco (24), (31).

Una variación a este método fue hecha por Chaney-Marbach (16) en la que el amonio desprendido se hace reaccionar con fenol-hipoclorito (Reacción de Berthelot) utilizando nitroprusiato de sodio como catalizador y el color azul de indofenol se cuantifica a 540 nm (13).

El método de aereación también depende de la conversión de urea a amonio pero la determinación del producto se hace por destilación de un ácido estándar y titulando otra vez con una base estándar (6), (30).

El tercer método depende de un producto coloreado directo formado por la acción de la urea con la 2,3 butadiona monoxima (disuelta en ácido acético al 10%) en presencia de un catalizador, produciendo un complejo colorido (32).

Se han hecho otras modificaciones al primer método, una de ellas es la seleccionada para este trabajo por su especificidad y rapidez ya que es un método enzimático (método de Talke y Schubert) (33):



Una mol de NADH se oxida por una mol de amoníaco causando un decremento en la absorbancia. Los fluoruros inhiben la reacción (falso

negativo) y la presencia de iones amonio aumenta los valores (falso positivo) (34).

Los valores de referencia para nitrógeno uréico oscilan entre 8 y 18 mg/dl y para urea de 10 a 50 mg/dl.

II.1.3.-Creatinina. La creatinina es un anhídrido de la creatina, que es a su vez un producto de la desfosforilación de la fosfocreatina, un fosfágeno que desempeña el papel de depósito o almacenaje de alta energía en tejido nervioso y músculo (8).

La creatina y fosfocreatina son sintetizadas en el hígado a partir de la glicina, arginina y metionina (2).

La creatinina no vuelve a ser reutilizada y se excreta continuamente por la orina, este metabolito no refleja la ingesta proteica o volumen urinario así que es preferible como prueba de evaluación renal ya que la creatinina es separada del plasma por filtración glomerular y excretada sin ser reabsorbida por los túbulos en ningún punto significativo. Esto da por resultado un rango de aclaramiento relativamente alto de creatinina comparándola con la urea (125 ml/min vs. 70 ml/min). Además cuando los niveles en plasma aumentan por encima de los valores de referencia, el riñón excreta creatinina a través de los túbulos.

Consecuentemente la creatinina en sangre en enfermedad renal no aumenta hasta que la función renal esta substancialmente dañada (4).

Para su determinación en el laboratorio es preferible el suero o plasma heparinizado a la sangre total, debido a la presencia de algunos cromógenos no creatininicos como los eritrocitos (5).

La creatinina aumenta en enfermedades musculares como distrofia muscular, atrofia, miositis así como en hipertiroidismo (11). Para su cuantificación se han desarrollado varios métodos.

El más ampliamente usado se basa en la reacción de Jaffé donde la creatinina reacciona con el ácido picrico en medio alcalino (35), con la consecuente producción de un tautómero rojo-amarillo de picrato de creatinina. Debe tenerse cuidado al recoger la muestra ya que hay varias sustancias que pueden interferir con esta reacción: acetona, ácido acetoacético, barbitúricos, ácido ascórbico, bromosulfaleína, etc. (36).

Otro método es por adsorción con el reactivo de Lloyd altamente específico, pero consume mucho tiempo. Se desproteiniza la muestra y la creatinina es adsorbida de un medio ácido hacia el reactivo de Lloyd, un silicato de aluminio y subsecuentemente se pasa a un medio alcalino (37).

La creatinina también ha sido cuantificada mediante la reacción con O-

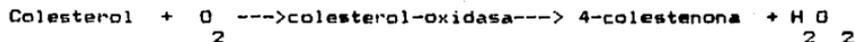
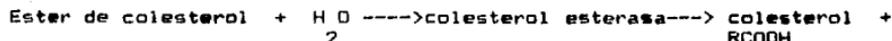
La cuantificación de colesterol total es muy importante cuando hay riesgo de infarto al miocardio. Aunque no sólo la determinación de contenido de colesterol basta para interpretar el potencial aterógeno en su totalidad ya que los triglicéridos permiten la detección en más del 95% de todas las hiperlipemias.

Algunas de las técnicas desarrolladas para su evaluación son:

La utilización del reactivo de Liebermann-Burchard, el colesterol se hace reaccionar con el ácido toluensulfónico en medio acético formando un complejo que con anhídrido acético y ácido sulfúrico concentrado torna a color verde y su intensidad es directamente proporcional a la cantidad de colesterol (44).

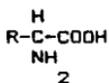
Un método directo de colorimetría que utiliza como reactivo ácido sulfúrico clorurado férrico y una solución de ácido acético glacial de colesterol ha sido usado especialmente por equipos automatizados, se produce una reacción de color más intensa y estable que la reacción de Liebermann-Buchard, pero es más sensible a la luz (42).

Existe otra técnica directa que emplea como reactivos el acetato férrico, acetato de uranio y ácido sulfúrico-sulfato ferroso, produciéndose un color púrpura que se mide a 560 nm, obteniéndose el máximo de color en 15 minutos (2). El método usado en este trabajo, es uno de los más recientemente desarrollados, específico puesto que es enzimático, no es necesario hacer una extracción previa del suero y se esquematiza a continuación (43):



Los valores de referencia son hasta 220 mg/dl no patológicos, sospecha en 240 mg/dl, elevados a partir de 260 mg/dl.

II.1.5.-Proteínas Totales. Las proteínas son compuestos nitrogenados, formados por varias clases de aminoácidos, cuya fórmula general es la siguiente:



son sustancias anfóteras debido a su ácido carboxílico y a su grupo amino básico. La actividad biológica de las proteínas reside en la organización estructural única de las moléculas de polipeptidos.

Es el hígado un importante órgano en el metabolismo protéico. Las proteínas del plasma poseen funciones específicas:

- 1.-Transporte: oxígeno, por la hemoglobina.
- 2.-Mantenimiento del equilibrio osmótico: albúmina.
- 3.-Defensa contra las infecciones: inmunoglobulinas, complemento.
- 4.-Hemostasis: factores de coagulación.
- 5.-La contribución a las necesidades de nitrógeno y la regulación de la actividad y función celular y otras funciones que incluyen las proteínas conjugadas y las enzimas (8,2).

La función protéica está disminuida en la desnutrición grave o privación protéica prolongada, hemorragias, proteinuria masiva y gastroenteropatía con pérdida de proteínas (5).

Para la determinación de proteínas totales la reacción de Biuret es la más ampliamente usada, se conoce desde hace casi 100 años y su fundamento consiste en reaccionar los enlaces peptídicos de las proteínas con una solución alcalina de cobre (7).

Desde entonces se han propuesto varias modificaciones para permitir el uso de un solo reactivo estable (34). La adición de sales de tartrato para mantener el cobre en solución ha tenido gran aceptación aunque se pierde cierta sensibilidad (45). Esta reacción es 100 veces menos sensible que el método de Kjeldahl, pero se utiliza en suero porque posee grandes cantidades de proteínas y por ende resulta práctico (2).

La técnica de Kjeldahl analiza nitrógeno de materiales, se hace una digestión de la muestra con ácido sulfúrico concentrado en presencia de un catalizador para liberar material carbonoso oxidado y nitrógeno en la forma de sulfato de amonio, a la alcalinización y destilación del amoniaco en un exceso conocido de un patrón ácido, sigue la titulación del ácido residual. Por otra parte el amoniaco liberado en la digestión puede reaccionar directamente con el reactivo de Nessler para formar un compuesto coloreado que se determina de manera espectrofotométrica (2).

Otro método consiste en hacer reaccionar la ninhidrina con los grupos libres de la proteína que origina un cambio de coloración (46).

Un método más para la determinación de proteínas es el que utiliza el reactivo de Folin-Ciocalteu en una solución alcalina; estos compuestos son reducidos a azul en presencia de tirosina y triptófano, dado que el fenol es el grupo oxidante se denomina también método del fenol (47).

Existen además métodos fisicoquímicos para la medición de este parámetro, en términos de rapidez y facilidad, la refractometría es recomendable para la medición de proteínas totales (48).

Según lo descrito es la reacción de Biuret la más práctica y es la utilizada en este trabajo, a continuación se resume:

Proteínas plasmáticas + Reactivo alcalino de cobre ----->

-----> Complejo azul violeta.

Un complejo se forma entre un metal (generalmente) y un grupo de iones o moléculas (10).

La intensidad de color es proporcional al número de enlaces peptídicos, sigue la Ley de Beer y pueden obtenerse falsos positivos con grandes cantidades de polidextrano (12).

11.2.-Validación de Métodos Analíticos.

Al obtener todos estos procedimientos analíticos se hace necesario determinar si realmente esta metodología provee información analítica útil. El decidir si el método es "útil" es todo un proceso, empezando por evaluar las características de la información obtenida, si estas cumplen las condiciones especificadas, ya que un método válido en una situación puede no serlo en otra, es por esto necesario validar el nuevo método obtenido a partir de nuestros ensayos.

El proceso de validación es una medida de la ejecución de un sistema analítico total, en otras palabras, el químico o técnico debe asegurarse que el método, instrumentos, reactivos, material y todo lo demás usado durante el ensayo son adecuados para cuantificar el metabolito deseado, en otras palabras, todos los parámetros se toman en cuenta para determinada prueba.

Un procedimiento puede ser probado para ambas cosas, exactitud y precisión. El planteamiento clásico para validación de una metodología analítica es analizar muestras de referencia que son similares en todos los aspectos a las muestras de prueba y después comparar los resultados con los valores esperados.

Se escoge un método en que la "recuperación" sea el ratio de la cantidad de metabolito obtenido por el ensayo contra la cantidad de metabolito en ese estándar, este análisis de valores conocidos se hace con soluciones estándar o sueros patrón.

La exactitud de un método puede variar a través de un rango de concentraciones posibles. Se puede extender de un 2 al 5% de error. La linealidad se define como la variación en la cantidad del metabolito recuperado por el ensayo como una función de la cantidad del metabolito en la muestra.

En resumen, la validación es una forma de medir la exactitud del método, esto es, para comparar la cercanía de las determinaciones hechas por el nuevo método a los valores verdaderos. Otros requerimientos para el método incluyen: especificidad, reproducibilidad, sensibilidad; estos pueden ser más flexibles que las pruebas de exactitud porque son funciones de precisión.

Para un método muy crítico o un método que ha sido ampliamente usado, la desviación estándar relativa entre todos los resultados no debe ser mayor del 2%. Por lo tanto los métodos de validación deben satisfacer los requerimientos de cada método, esto es, las necesidades del proceso que se enuncia nuevamente a continuación: exactitud, precisión, especificidad, límites del método (sensibilidad) y que sea un método práctico.

III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

III.-Planteamiento del Problema.

La mayoría de los análisis que se realizan en un laboratorio clínico, requieren sangre completa, suero o plasma. La porción líquida de la sangre circulante o no coagulada es el plasma. El suero es plasma donde el fibrinógeno ha sido removido por el proceso de coagulación.

En Química Clínica uno de los problemas más importantes es la toma de muestra, ya que una muestra adecuada debe llenar diversas condiciones.

Existen cuatro condiciones relevantes para la exactitud del subsecuente análisis clínico y son:

- 1.-Estasis (detención del fluido sanguíneo por el uso de torniquete): debe usarse un mínimo de tiempo o se tendrá una hemoconcentración.
- 2.-No debe tomarse sangre cuando se aplican soluciones intravenosas.
- 3.-Usar jeringas o vacutainers limpios y secos para evitar contaminación o hemólisis.
- 4.-Cuando se use anticoagulante mezclar bien para evitar la coagulación.

Es necesario tomar un volumen adecuado de sangre para determinar las pruebas que sean necesarias, evitar la hemólisis por cualquier causa, conservar la muestra adecuadamente y controlar el tiempo que transcurre entre la toma de muestra y el proceso analítico.

A todo este conjunto de características se les denomina VALOR DE LA MUESTRA. Siendo el valor de la muestra decisivo en la obtención de resultados adecuados y siendo también un problema muy importante en los laboratorios clínicos la punción de venas poco accesibles, se considera muy importante explorar la exactitud y precisión de las técnicas clínicas desarrolladas con microtécnicas.

Si se logra una microtécnica que reproduzca un dato de una macrotécnica se está dando un paso muy importante y si además esta microtécnica es adecuada para un método manual y/o semiautomático será mayor su importancia por lo accesible a cualquier laboratorio. Por otro lado se presentan varias ventajas como el ahorro de tiempo y costo (20).

Observando la serie de problemas descritos anteriormente, se elige este tema como trabajo de tesis, ya que: si se obtienen las condiciones adecuadas para trabajar una microtécnica se tendrán las siguientes ventajas:

- 1.- Una micromuestra de sangre es más sencilla de obtener que una muestra venosa.
- 2.- El costo de operación sería más bajo.
- 3.- El tiempo que transcurre desde la obtención de la muestra hasta el resultado se acorta.
- 4.- El costo de reactivos se minimiza por lo que se esta en condiciones de utilizar reactivos muy caros para macrotécnicas pero costeables para microtécnicas.

5.- El valor de la muestra en general podrá obtenerse quizás más fácilmente que para una macromuestra.

En la actualidad existen determinadas pruebas que no pueden ensayarse en una forma práctica con micromuestras, por ejemplo: gases en sangre, aunque la mayoría de las técnicas presentan posibilidad de desarrollo de este tipo de tecnología, a partir de una muestra obtenida por punción de lóbulo de oreja o en yema de dedo.

Para todas las técnicas se ensayan diversos métodos, buscando precisión, exactitud y linealidad del método, además de reducir costos.

IV OBJETIVOS

IV OBJETIVOS.

IV.1.- Objetivo General: desarrollar un método analítico para cada uno de los principales metabolitos, con la mínima cantidad de muestra.

IV.1.1.-Objetivo particular: desarrollar una metodología analítica aplicable en el laboratorio de diagnóstico clínico que requiera la mínima cantidad de muestra para su análisis, de los siguientes metabolitos: glucosa, urea, creatinina, colesterol y proteínas totales.

IV.1.2.-Objetivo particular: validar la linealidad de cada método analítico obtenido.

V HIPOTESIS DE TRABAJO

V. HIPOTESIS DE TRABAJO

V.- Hipótesis: las hipótesis de este trabajo serán planteadas de acuerdo a la metodología estadística de Pearson y Neymann.

Hipótesis de trabajo: desarrollar una metodología analítica aplicable en el laboratorio de diagnóstico clínico que requiera la mínima cantidad de muestra para su análisis, de los siguientes metabolitos: glucosa, urea, creatinina, colesterol y proteínas totales con un grado de confiabilidad mayor del 95%.

Hipótesis alterna: que esta metodología se desarrolle con una confiabilidad igual o menor al 95%.

VI MATERIAL

VI.- Material.

VI.1.-Material biológico: suero.

VI.2.-Material de laboratorio:

Tubos de ensayo de 13 X 100.

Tubos de ensayo de 12 X 75.

Gradillas.

Pipeta automática de 0.2, 0.3, 0.6 y 1.0 ml.SMI.

Pipeta automática de 100, 150 y 200 microlitros. SMI.

Pipeta automática de 50, 75 y 100 microlitros.SMI.

Pipeta automática de 10, 20 y 25 microlitros. SMI.

Pipetas graduadas en centésimas de 1 ml. Pyrex.

Pipetas graduadas de 0.1 y 0.2 ml. Pyrex.

Pipetas graduadas de 5 y 10 ml. Pyrex.

Vasos de precipitados de 100, 250 y 500 ml.Pyrex.

Matraces aforados de 50, 100, 250 ml. Pyrex.

Matraces Erlenmeyer de 50, 100, 250 ml. Pyrex.

Frascos ámbar varias capacidades.

VI.3.-Equipos:

Espectrofotómetro de muestreo discreto, Modelo Spectronic 2100
Clinical Analyzer. Marca Bausch & Lomb.

Centrifuga clínica. Damon/IEC Division.

Balanza analítica. S-200. Bosch.

Baño María. Precision Scientific Industries.

Computadora Printaform 10 MHz.

Impresora Delta Serie 2000.

VI.4.- Reactivos:

Glucosa oxidasa-peroxidasa (GOD). Lakeside.

Patrones de glucosa.

Reactivo enzimático para urea (Enzymatic BUN-reagent rate) Beckman.

Patrones de urea.

Patrones de creatinina.

Acido picrico 0.04 M.

Solución amortiguadora de carbonatos, pH= 10.8.

Hidróxido de sodio 0.75 N.

Reactivo enzimático para colesterol. Monotest CHOD-PAP. Lakeside.

Patrones de colesterol.

Reactivo para proteínas totales. Biuret. Lakeside.

Hidróxido de sodio al 3%.

Sulfato cúprico al 1%.

Patrones de proteínas totales.

Sueros control: Seronorm-Merck, Universal control serum-Lakeside,

Precinorm U-Boehringer, Precipath U-Boehringer, Monitrol.

VII METODOS

VII.- Métodos.

Algunas condiciones para el proceso de la muestra se regulan directamente en el espectrofotómetro y son:

- (1) TAM: tiempo de aspiración de la muestra: es el tiempo que transcurre desde el contacto muestra-reactivo hasta que se aspira por el equipo.
- (2) TI: tiempo de inicio: es el tiempo que se da desde el contacto muestra-reactivo hasta que se inicia el proceso de lectura (en este periodo está incluido el TAM).
- (3) TIA: tiempo de inicio automático: tiempo transcurrido desde el contacto muestra-reactivo hasta que se inicia el proceso de lectura automáticamente (la operación de aspiración e inicio es conjunta).
- (4) RI: reposo inicial: es el tiempo de reposo de la muestra dentro de la celda hasta que se lleva a cabo la lectura.
- (5) IC: intervalo cinético: es el tiempo entre la primera y segunda lecturas de absorbancia cuando la determinación es cinética.
- (6) T: temperatura: es la temperatura a la cual se encuentra la muestra en la celda al momento de la lectura.
- (7) L: longitud de onda a la cual se lee en esa determinación.

VII.1.- Glucosa.

VII.1.1.- Punto final.

- 1.-En tubos de ensayo de 12 X 75 colocar 20 microlitros de suero diluido 1:10 de cada muestra problema y de cada estándar de glucosa.
- 2.-Agregar 1.0 ml de reactivo de glucosa (GOD). Mezclar.
- 3.-Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- 4.-El equipo debe encontrarse bajo las siguientes condiciones: temperatura 32 grados y longitud de onda 578 nm.
- 5.-Leer ajustando a cero con blanco de reactivos.

Esta técnica puede modificarse usando 50 microlitros de muestra 1:10 y un mililitro de reactivo.

VII.1.2.- Cinética.

- 1.- Montar en tubos de ensayo para cada muestra y estándar un mililitro de reactivo GOD.
- 2.- Colocar el equipo bajo las siguientes condiciones:
TAM= 10" RI= 5" L= 578 nm.
TI= 20" T= 32 G. IC= 30".
- 3.- Agregar 50 microlitros de cada muestra y estándar en los tubos de reactivo, mezclar.

4.- Iniciar el proceso de lectura inmediatamente.

Este método también puede ensayarse con 50 y 25 microlitros de muestra (1:10) y un mililitro de reactivo para el primer caso y 0.5 ml para el segundo.

VII.2.- Urea.

VII.2.1.- Urea cinética.

- 1.- Para cada muestra y patrón, colocar un tubo de 12 X 75 con 0.5 ml de reactivo para urea.
- 2.- Ajustar el equipo de la siguiente forma:
TAM= 10" RI= 5" L=340 nm
TI= 20" T= 32 grados IC= 30"
- 3.- Agregar 25 microlitros de muestra y patrón (en dilución 1:10), agitando, puede montarse también con 50 microlitros de muestra 1:10.
- 4.- Iniciar la lectura.

VII.3.- Creatinina.

VII.3.1.- Punto final.

- 1.- Encontrándose el equipo en las siguientes condiciones:
TAM= 10" RI= 5"
TI= 20" T= 30 grados.
- 2.- Mezclar 1.0 ml de reactivo de ácido picrico alcalino con 100 microlitros de cada problema y patrón.
- 3.- Iniciar la lectura a 520 nm.
Una variante de esta técnica fue con temperatura de 32 grados.

VII.4.- Colesterol.

VII.4.1.- Punto final.

- 1.- En tubos de ensayo de 12 X 75 colocar 50 microlitros de cada muestra y patrón (en dilución 1:10). Montar también un blanco de reactivos.
- 2.- Agregar a cada tubo 0.5 ml de reactivo enzimático para colesterol y mezclar.
- 3.- Incubar 10 minutos a 37 grados.
- 4.- Leer a 530 nm ajustando a cero con el blanco.

El volumen de muestra también puede usarse con 25 microlitros diluidos 1:10.

VII.5.- Proteínas totales.

VII.5.1 Punto final.

1.- Con el equipo ajustado de la siguiente forma:

TAM= 10"

RI= 5"

TI= 20"

T= 30 grados

2.- Agregar 100 microlitros de cada muestra y patrón (1:10) en los tubos de ensayo.

3.- Agregar 0.1 ml de reactivo cúprico y 0.5 ml de hidróxido de sodio al 3% .Agitar.

4.-Leer enseguida a 545 nm contra blanco de reactivo.

VIII RESULTADOS

VIII.- Resultados.

Metabolito:	Tipo de reacción:	Codiciones de reacción:	Concentración adicionada: (mg/dl)	Concentración recuperada: (mg/dl)
1 Glucosa	1 Punto final	1 20 mcl 1.0 ml.	50	49
			50	50
			50	50
			50	50
			50	49
			100	67
			100	75
			100	80
			100	76
			100	75
			200	199
			200	201
			200	199
			200	200
			300	294
			300	305
			300	295
			300	303
			400	327
			400	333
400	323			
400	335			
400	339			
1 Glucosa	1 Punto final	2 50 mcl 1.0 ml	50	49
			50	50
			50	50
			50	50
			100	98
			100	100
			100	102
			200	197
			200	201
			200	199
			300	297
			300	299
			300	299
			400	395
			400	401
			400	394
			400	402

1 Glucosa	2 Cinética	1 50 mcl 1.0 ml	50	35
			50	42
			100	118
			100	120
			200	210
1 Glucosa	2 Cinética	2 25 mcl 0.5 ml	200	215
			400	416
			50	45
			50	49
			100	92
1 Glucosa	2 Cinética	3 50 mcl 1.0 ml	100	99
			200	194
			200	198
			400	422
			400	431
1 Glucosa	2 Cinética	3 50 mcl 1.0 ml	400	423
			50	49
			50	50
			100	97
			100	98
2 Urea	2 Cinética	2 50 mcl 0.5 ml	200	203
			200	210
			400	408
			400	413
			30	44
2 Urea	2 Cinética	2 50 mcl 0.5 ml	30	50
			65	81
			65	88
			1.2	1.8
			1.2	1.2
3 Creatinina	100 mcl	1.0 ml 30 grados	1.2	1.0
			1.2	1.2
			1.2	1.0
			3.0	3.1
			3.0	3.2
3 Creatinina	100 mcl	1.0 ml 30 grados	3.0	3.1
			3.0	3.1
			6.0	6.6
			6.0	6.0
			6.0	6.3

			12.0	11.8
			12.0	12.9
			12.0	13.4
			24.0	20.4
			24.0	21.4
			24.0	23.0
3 Creatinina	100 mcl	1.0 ml	1.2	1.9
		32 grados	1.2	1.5
			3.0	3.3
			3.0	3.8
			6.0	7.0
			6.0	7.1
			12.0	14.0
			12.0	14.3
4 Colesterol	1 Punto	25 mcl	100	111
	final	0.5 ml	100	107
			100	108
			200	176
			200	181
			200	189
			300	284
			300	274
			300	267
			400	355
			400	385
4 Colesterol	1 Punto	50 mcl	100	104
	final	0.5 ml	100	98
			100	109
			200	187
			200	203
			200	194
			300	290
			300	289
			300	302
			400	383
			400	399
			400	388

IX DISCUSION DE RESULTADOS

IX.- Discusión de resultados.

IX.1.- Parte analítica.

Es indudable que la microtécnica es la técnica de actualidad y del futuro en la Química Clínica. En nuestro país se sigue practicando la punción venosa para obtener una muestra que permita realizar varias determinaciones y repetir cualquiera de ellas en caso necesario, para su ratificación. La punción venosa continuará por mucho tiempo, sobre todo cuando se trata de una orden extensa y aún cuando solamente sea una glucosa sanguínea.

Aún en países desarrollados como Estados Unidos, Alemania y Japón se sigue practicando este método. Esta es una de las razones tomadas en cuenta al elaborar este trabajo, demostrándose que:

1.- Es posible hacer una determinación exacta con una pequeña cantidad de suero (sin emplear técnicas automatizadas).

2.- En muchos casos es posible no utilizar la punción venosa evitando así molestias al paciente, además del considerable ahorro económico para el laboratorio.

Con volúmenes pequeños de muestra la toma de producto se reduciría a punción capilar del lóbulo de oreja o pulpejo de dedo, consecuentemente el gasto de laboratorio se reduciría por lo menos a la mitad. Un cálculo al azar indica que si se tomara la cantidad de glucosas por día, llevaría a un ahorro de varios miles de jeringas desechables.

Sería muy fácil decir que el problema se soluciona automatizando el laboratorio, pero esta medida es contraproducente incluyendo el sentido económico. Fue el propósito de este trabajo reducir la tecnología para los medios con que cuentan los laboratorios promedio en México, pero si fuera necesaria una inversión que esta sea la mínima y que a la postre represente un ahorro substancial, aunque quizás sea con un mayor esfuerzo.

Las condiciones básicas requeridas son diversas:

- a) Tecnología rápida y precisa.
- b) Exactitud en la medida de la muestra.
- c) Condiciones adecuadas de la medida de color obtenido.
- d) Condiciones de control de tiempo y temperatura, etc.

Por todas estas razones se ha encontrado que describir una técnica como única y que sea la mejor para seguir los pasos analíticos, no es posible. En cada caso el laboratorio deberá buscar cual es la microtécnica mínima a la que puede aspirar, habrá casos en los que la glucosa se obtenga con mucha exactitud con sólo dos microlitros de suero y habrá otros en que se tengan que usar diez o hasta cincuenta microlitros, todo dependerá como se ha dicho, del equipo y la instrumentación con que se cuente.

En este trabajo se encontraron las condiciones adecuadas para trabajar algunas determinaciones con microtécnica con un espectrofotómetro (semiautomático) marca Bausch & Lomb, modelo Spectronic 2100 Clinical Analyzer y por consiguiente en cuanto se cambie de aparato se deben cambiar las condiciones de trabajo, ya que no es posible aplicar la misma técnica a todos los aparatos.

Respecto a los aparatos de medida, son verdaderamente críticos ya que se pueden usar capilares calibrados, pipetas automáticas de punta desechable o pipetas automáticas de capilar fijo. No es recomendable usar el equipo tradicional de vidrio (pipetas de Kahn, pipetas de Sahli, pipetas de Thoma, etc.) porque inmediatamente los resultados disminuyen en su calidad y caen fuera de exactitud controlable, en este trabajo se usaron comparativamente pipetas automáticas de punta desechable y pipetas automáticas de capilar fijo, por lo que es posible asegurar que con las precauciones adecuadas éstas últimas son las más recomendables y económicas.

El volumen de la celda de lectura utilizada en el espectrofotómetro es de 0.5 ml, asegurando este volumen se puede tener la confianza de que en cada lectura la celda esta llena y así la lectura será correcta, por lo tanto las técnicas descritas utilizan un volumen igual o mayor que este. Como en las técnicas automatizadas se controló el factor temperatura sin intervención directa del operador.

También se aprovechó de la tecnología moderna el ahorro de tiempo para algunas técnicas, al estudiarse el comportamiento cinético de la reacción en cuestión. En varias de las técnicas se lograron resultados muy adecuados, no así en otras donde se recurrió a la técnica de punto final.

Las técnicas que se estudiaron cinéticamente se estudiaron comparativamente con las respectivas de punto final y hasta que no se encontró una correlación adecuada entre ambos datos no se aceptó la técnica cinética.

En resumen, la tecnología que se esta discutiendo está diseñada para usarse con el espectrofotómetro del modelo indicado y con pipetas automáticas de capilar fijo marca SMI.

En las tablas de resultados se observan los datos obtenidos de cada técnica, variando primordialmente el volumen de muestra, se aprecia también que en muchas técnicas es conveniente diluir el suero y no tratar de medir microcantidades directamente, es decir se tiene que tener el dato, de cual es el volumen mínimo que podemos medir con precisión usando las pipetas de que se dispone, por ejemplo, en este caso el volumen mínimo es de 25 microlitros, por lo tanto se puede medir este en suero directo (sin diluir) o el mismo con suero diluido, desde luego la dilución es muy importante y para no perder la exactitud, hay que tener un límite en la dilución, el cual varía de técnica a técnica pero en general la dilución óptima encontrada es de 1:10.

Es muy importante conservar la relación volumen-muestra, volumen total. Se observó que cuando se trabaja un mismo volumen de muestra con distintos volúmenes de reactivo los resultados no son proporcionales. Esto viene descrito por la "Ley de la composición constante o definida" que dice: "la cantidad necesaria de un elemento para combinarlo con un peso dado de otro elemento, es siempre la misma" (9).

En la Tabla 1 se presentan los datos de la determinación de glucosa (GOD) llevada a punto final, para esta técnica es indispensable hacer una dilución previa del suero. No puede trabajarse con suero directo ya que el color desarrollado es demasiado intenso para medirse. Se utilizó una sola dilución 1:10 hecha con agua destilada y se ensayaron distintos volúmenes de muestra con diversos volúmenes de reactivo, la proporción más adecuada fueron 50 microlitros de suero diluido 1:10 y 1.0 ml de reactivo en donde se obtuvo una linealidad hasta de 400 mg/dl de glucosa.

En esta técnica GOD se ensayó en forma cinética, Tabla 2, utilizando volúmenes entre 25 y 50 microlitros de dilución con 0.5 y 1.0 ml de reactivo respectivamente, en este caso con esta técnica lo más importante que se encontró fue tener un control exacto del intervalo cinético (IC), sin embargo, dado que un segundo puede tener una influencia decisiva en el resultado final de la técnica cinética, trabajada con dilución, no es muy recomendable y sólo dará un dato aproximado en un momento de suprema urgencia.

Sorpresivamente se encontró que esta técnica trabajada con volúmenes grandes de suero directo (50 microlitros de suero y 1.0 ml de reactivo) rinde resultados muy satisfactorios de tal forma que es recomendable que si se va a trabajar en forma cinética se use la proporción indicada en la tabla.

En la Tabla 3, se encuentran los datos obtenidos al trabajar la técnica de urea enzimática en la zona UV. Esta técnica ya ha sido desarrollada ampliamente, de tal forma que sólo se buscó el volumen mínimo necesario, encontrándose que 25 microlitros de la dilución 1:10 con 0.5 ml de reactivo proporcionaron los datos más precisos, además de que el resultado se obtiene rápidamente por tener un intervalo cinético corto.

La creatinina, Tabla 4, representó un reto dado las dificultades encontradas para llegar a desarrollar una técnica confiable. Se decidió desde un principio aplicar la técnica cinética, en la cual, se usan normalmente 100 microlitros de suero directo y 1.0 ml de reactivo, sin embargo considerando que para una microtécnica 100 microlitros de suero es un volumen excesivo se empezó a trabajar con la dilución 1:10 donde prácticamente no hubo obtención de datos, por lo que sólo se decidió buscar la reacción más rápida y apropiada, fue aquí donde se observaron diversos fenómenos:

El tiempo de lectura de 60" que indica la técnica no era apropiado ya que perdía linealidad.

La temperatura también debe ser controlada rigurosamente ya que a mayor temperatura mayor riesgo de perder linealidad. La temperatura óptima encontrada fue entre 30-32 grados.

Se tienen que hacer modificaciones de acuerdo a la sensibilidad de cada aparato, se ensayaron varias mezclas de alcali fuerte y bicarbonato para obtener un reactivo estable y sensible.

Este es un punto muy importante que ha de tomarse en cuenta, ya que una mezcla con reactivo demasiado sensible indica inestabilidad muy acelerada y otras, un reactivo muy poco sensible demostraba un pequeño cambio de absorbancia especialmente en concentraciones bajas de creatinina, el reactivo óptimo encontrado es el siguiente: 9 partes de ácido pícrico 0.04M, 9 partes de amortiguador de bicarbonatos con pH= 10.8 y dos partes de hidróxido de sodio 0.75 N que refrigerado se mantiene estable 24 horas.

Se hicieron muchos intentos para trabajar en forma confiable con dilución, sin embargo, se llegó al convencimiento de que en esta determinación debe usarse suero directo y el volumen mínimo es relativamente grande, pero con volúmenes menores se pierde inmediatamente la linealidad y seguridad de los resultados, este volumen mínimo encontrado fue de 100 microlitros trabajando con 1.0 ml de reactivo y temperatura de 30 grados.

De acuerdo a la solicitud de las determinaciones bioquímicas se puede decir que las tres técnicas descritas pueden considerarse como la química sanguínea básica. Enseguida se discutirán en forma breve las otras dos técnicas que proporcionaron datos confiables.

Para el colesterol, se encuentra que la determinación se hace en suero directo (sin extracción previa), utilizando un blanco de reactivos. Es una técnica precisa y rápida, ya que el tiempo de incubación es de 10 minutos solamente. Aunque el reactivo enzimático es caro el gastar sólo 0.5 ml hace bastante costeable la técnica.

La linealidad obtenida llegó hasta 400 mg/dl, por lo que para valores mayores se tendrá que diluir 1:20 con solución salina o agua destilada. Se observa que con un volumen de muestra de 50 microlitros (diluidos 1:10) y 0.5 ml de reactivo se obtienen los datos más exactos que con un volumen de muestra menor.

La temperatura es la usada normalmente en todas las técnicas de 37 grados. Se observó que la lectura debe hacerse dentro de la primera media hora de terminar el tiempo de incubación.

En lo que respecta a proteínas totales, se usó la prueba de Biuret que es la prueba de rutina en los laboratorios, es una prueba simple y el color obtenido se encontró estable por aproximadamente 45 minutos, se usa un blanco de reactivos, se observó también que es mejor diluir la muestra que trabajarla directamente.

Los ensayos se hicieron con reactivo cúprico comercial, pero se

aumentó la alcalinidad agregando hidróxido de sodio al 3%, obteniéndose resultados más exactos, por lo que es en esta concentración alcalina (mayor del 3%) donde se obtiene el máximo desarrollo de color, el tiempo de incubación fue de 10 minutos, el equipo se coloca en inicio inmediato, con una longitud de onda de 545 nm. Aunque se ensayaron concentraciones mayores de hidróxido de sodio se observa que no producen resultados adecuados.

IX.2 Análisis matemático.

Como se ha mencionado antes, es necesario asegurar que un nuevo método proporcione datos analíticos útiles, es decir sea un método reproducible y exacto, esto es lo que se llama validar un método, que no es otra cosa sino observar y comprobar que en este método existe una correlación positiva entre las dos variables medidas.

Al explicar esto con detalle, se refiere a "X" como la cantidad de muestra adicionada (variable independiente) y "Y" como la cantidad de muestra recuperada (variable dependiente). Pensando en esto puede asegurarse que si se grafican los resultados obtenidos después de la medición de las dos variables, se obtiene una recta que será la "más perfecta" posible en cuanto más parecidos sean los datos de la muestra recuperada en relación con los datos de la muestra adicionada.

Una recta "perfecta" por sí misma, es una situación ideal, por lo que es menester buscar construir una recta a partir de los datos obtenidos. Al graficar "X" contra "Y", a cada valor de "X" en la recta corresponde un valor similar para "Y" (teóricamente hablando), pero existe además el valor de "Y" obtenido en la práctica (un valor real) y se denomina "Y^", como ejemplo para X1 se tiene en la gráfica Y1 y Y^1, para X2 se tiene Y2 y Y^2 y así sucesivamente. La diferencia entre los valores de "Y" (Y^ - Y) es el error de la técnica (error i), el cual puede ser, dependiendo de cada valor, positivo o negativo, pueden incluso anularse entre sí debido a la diferencia de signos y la suma de e = 0.

i

Se desearía entonces que el error sea mínimo, puesto que no es eliminable, es decir que el error tienda a cero, ya que es lógico entonces que las diferencias entre el valor estimado y el observado son mínimas. Otra forma de eliminar signos de estas diferencias de "Y" y manejar valores absolutos es elevando al cuadrado dicha cantidad, obteniéndose la siguiente fórmula:

$$e_i^2 = (Y_i^{\wedge} - Y_i)^2$$

Además de que para englobar cada dato se tiene que:

$$\sum_i e_i^2 = \sum_i (Y_i^{\wedge} - Y_i)^2$$

De esta ecuación y de la ecuación de una recta ($y=mx + b$) se obtiene la Ecuación de mínimos cuadrados.

En resumen a partir de los datos obtenidos en el laboratorio puede construirse una recta, pero a su vez se debe de tener la seguridad de que estos datos forman verdaderamente parte de una recta, en otras palabras corroborar si se comportan linealmente. Hasta esta conclusión es posible llegar con el "Análisis de la Varianza de la Regresión Lineal".

Como primer punto hay que considerar dos tipos de variaciones :

-la primera debida al error experimental, que es la variación de los datos debido a la medición.

-la segunda debida a que el fenómeno no es una recta.

Si la variación se debe al primer caso, aún al estar los puntos fuera de la recta, es el fenómeno es una recta y se llama "Regresión" (R), por el contrario si las variaciones se deben al segundo caso se tiene un "Error de la Regresión" (ER), por tanto el fenómeno no se comporta como una recta.

De "R" se obtiene MCR que es la media de cuadrados de la regresión y de "ER" se llega a MCER que es la media de cuadrados del error de la regresión. Si se establece una relación entre ambas como FR se obtiene"

$$FR = \frac{MCR}{MCER}$$

donde si F posee un valor alto, el fenómeno es una recta (puesto que el dividendo (MCR) es mucho más grande que el divisor (MCER)) y por el contrario si F es pequeña el fenómeno no es una recta.

Otra forma de concluir esto es mediante una regla de decisión como:

- 1.- Si $P(F)$ es menor que 0.05 el fenómeno es una recta.
- 2.- Si $P(F)$ es mayor que 0.05 el fenómeno no es una recta.

Para mencionarlo de otra forma, se dice que lo ideal en una serie de datos es que la cantidad recuperada (Y) sea igual a la cantidad adicionada (X), o sea $X=Y$, por lo tanto se tiene que tener entonces una pendiente igual a uno ($m=1$) y una ordenada al origen igual a cero ($b=0$).

Si se cumplen estas dos condiciones puede decirse que el fenómeno se comporta como una recta (sólo existe error experimental).

Si el fenómeno es lineal, pero "Y" es muy diferente de "X", el error es sistemático, presentándose varios casos:

- 1.- $m=1$ y $b=0$, no hay error proporcional.
- 2.- $m=1$ y b diferente de cero, hay error proporcional constante.
- 3.- m diferente de uno y $b=0$, existe error proporcional consistente.
- 4.- m diferente de uno y b diferente de cero, existe error proporcional consistente y constante.

El comprobar que estos dos parámetros (" m " y " b ") son igual a uno y cero respectivamente puede hacerse de manera estadística con las siguientes fórmulas:

1.- Para la pendiente ($m=1$):
$$t_m = \frac{1 - m}{S_m}$$

Si t calculada es mayor que t de tablas con $n - 2$ g.l., la pendiente es diferente de uno.

2.- Para la ordenada al origen ($b=0$):
$$t_b = \frac{0 - b}{S_b}$$

Si t calculada es mayor que t de tablas con $n - 2$ g.l. la ordenada al origen es diferente de cero.

Para finalizar esta breve explicación se resumen las variables estadísticas utilizadas para concluir acerca de la linealidad de los métodos ensayados:

- 1.- La P(F)R debe ser menor que 0.05 para que el método sea lineal.
- 2.- La P(F)A debe ser mayor que 0.05 para que no haya falta de ajuste, si no es así se observa el valor de R^2 (coeficiente de determinación), cuyo valor debe ser mayor de 0.95 para que se cumpla esta condición.
- 3.- El rango de la pendiente debe incluir uno para que no haya error sistemático proporcional consistente.
- 4.- El rango de la ordenada al origen debe incluir cero para que no exista error sistemático proporcional constante.

A continuación se exponen los resultados de los parámetros estadísticos hechos a cada determinación con ayuda de la computadora y se comenta sobre estos:

1.1.1. Glucosa. Punto Final. 20 μ cl + 1.0 ml. Rango 50-400 mg/dl.

	MC	F	R ²	m	b
REGRESION	302872	616	0.9671	0.8645	6.45
ERROR REGRESION	491.18	1.3 x 10 ⁻⁸		0.9412	24.29
FALTA DE AJUSTE	3321	171.3			
ERROR EXP.	19.39	9.05 x 10 ⁻⁸		0.7958	-11.37

1.- El método es lineal ya que P(F) es igual a 1.37×10^{-8} . Esto es menor que 0.05.

2.- La P(F)A es de 9.05×10^{-8} , menor que 0.05 por lo que se observa el valor de R2 el cual es mayor de 0.95, por lo tanto no hay falta de ajuste.

3.- El valor de "m" no abarca uno, se tiene un error proporcional consistente.

4.- El intervalo de la ordenada al origen abarca cero, no se tiene error proporcional constante.

Dado que el error proporcional consistente que presenta este método puede ser debido al exceso de glucosa con respecto a la velocidad de reacción de la enzima y el método no sea estequiométricamente equivalente en los 400 mg/dl se repite el análisis estadístico en el rango de 50 a 300 mg/dl.

1.1.1. Glucosa. Punto Final. 20 μ cl + 1.0 ml. Rango 50-300 mg/dl.

	MC	F	R2	m	b
REGRESION	142753	16180.5	0.99932	0.99887	-0.26611
ERROR REGRESION	8.8225	1.22×10^{-7}		1.01615	3.2319
FALTA DE AJUSTE	0.4375	0.04525			
ERROR EXP.	9.66	0.91776		0.98159	-3.76412

1.- La P(F) es de 1.22×10^{-7} menor que 0.05 por lo que el fenómeno se comporta linealmente.

2.- La P(F)A es 0.91776 mayor a 0.05, por lo tanto no hay falta de ajuste.

3.- El rango de la pendiente incluye uno, no existe error proporcional consistente.

4.- El rango de la ordenada al origen incluye cero, por lo que tampoco existe error proporcional constante.

5.- El método es lineal de 50 a 300 mg/dl, y está validado.

1.1.2. Glucosa. Punto Final. 50 mc1 + 1.0 ml. Rango de 50 a 400 mg/dl.

	MC	F	R2	m	b
REGRESION	335941	62107	0.99974	0.99239	0.30127
ERROR REGRESION	5.4090	5.64 x 10 ⁻⁹		1.00084	2.05797
FALTA DE AJUSTE	0.5833	0.08935			
ERROR EXP.	6.528	0.98718		0.98395	-1.90543

1.- La P(F) es de 5.64 X 10⁻⁹ un valor menor a 0.05. por lo que el método es lineal.

2.- La P(F)A es mayor de 0.05, por lo que no hay falta de ajuste.

3.- El intervalo de "m" incluye uno, no existe entonces error proporcional consistente.

4.- El rango de "b" abarca cero, no hay error proporcional constante.

5.- El método esta validado en un rango de 50 a 400 mg/dl.

1.2.1. Glucosa. Cinética. 50 mc1 + 1.0 ml. Rango de 50 a 200 mg/dl.

	MC	F	R2	m	b
REGRESION	29681	172.09	0.97728	1.12786	-8.25
ERROR REGRESION	172.47	8.59 x10 ⁻⁴		1.36656	23.32719
FALTA DE AJUSTE	650.91	50.0703			
ERROR EXP.	13	1.56 x10 ⁻⁵		0.88916	-39.8271

1.- El valor de P(F) es 8.59 X 10⁻⁴ (menor a 0.05), por lo tanto el método es lineal.

2.- La P(F)A es de 1.56 X 10⁻⁵, lo cual es menor a 0.05, enseguida se observa el valor de R2 (igual a 0.97728) el cual es mayor a 0.95, no hay falta de ajuste.

3.- No hay error proporcional consistente puesto que el rango de "m" incluye uno.

4.- No existe error proporcional constante puesto que el intervalo de "b" abarca cero.

5.- Por lo tanto el método esta validado de 50 a 200 mg/dl.

1.2.2. Glucosa. Cinética. 25 mcl + 0.5 ml. Rango de 50 a 400 mg/dl.

	MC	F	R2	m	b
REGRESION	218176	4652	0.9985	1.08924	-12.95
ERROR REGRESION	46.89	4.39 x 10 ⁻⁶		1.127	- 3.324
FALTA DE AJUSTE	119.59	6.704			
ERROR EXP.	17.83	.039		1.051	-22.579

1.- La P(F) es menor a 0.05 el método es lineal.

2.- La P(F)A es menor a 0.05, por lo tanto se requiere el valor de R2 que es de 0.9985 (mayor a 0.95), por lo tanto no hay falta de ajuste.

3.- El método posee error proporcional consistente ya que el rango de "m" no incluye uno.

4.- No posee error proporcional constante porque el rango de "b" incluye cero.

5.- Probablemente la cantidad de reactivo debió ser mayor para no perder la linealidad a una concentración grande de 400 mg/dl ya que si se observa en el caso 1.1.1 la relación volumen muestra, volumen reactivo era mayor para este último en relación al volumen muestra. Por lo tanto se repetirá el análisis estadístico para un rango de 50 a 200 mg/dl.

1.2.2. Glucosa. Cinética. 25 mcl + 0.5 ml. Rango de 50 a 200 mg/dl.

	MC	F	R2	m	b
REGRESION	23100	2187	0.99818	0.995	-3.25
ERROR REGRESION	10.56	2.05 x 10 ⁻⁴		1.054	4.564
FALTA DE AJUSTE	1.734	0.12847			
ERROR EXP.	13.5	0.7621		0.935	-11.06

1.- La P(F) es menor a 0.05, el método es lineal.

2.- La P(F)A es de 0.7621 mayor a 0.05, por lo tanto no hay falta de ajuste.

3.- El rango de "m" abarca uno, no hay error proporcional consistente.

4.- El rango de "b" incluye cero por lo que tampoco hay error proporcional constante.

5.- El método está validado en un rango de 50 a 200 mg/dl.

1.2.3. Glucosa. Suero directo. 50 μ l + 1.0 ml. Rango de 50 a 400 mg/dl.

	MC	F	R ²	a	b
REGRESION	154338	1.3248	0.99955	1.03617	-3.282
ERROR REGRESION	11.649	9.68 x10 ⁻⁶		1.0582	1.794
FALTA DE AJUSTE	15.968	1.680			
ERROR EXP.	9.5	0.295		1.041	-8.359

Cumple con los puntos 1 y 2 pero "m" no incluye uno. Se repite el mismo caso de las técnicas anteriores se pierde la linealidad en 400 mg/dl y aunque aquí es muy diferente la proporción entre volumen de muestra-reactivo (puesto que la muestra es suero directo sin diluir) puede pensarse que no sólo está influyendo el volumen de reactivo sino que este en realidad se satura rápidamente. Se repite el análisis en un rango de 50 a 200 mg/dl.

1.2.3. Glucosa. Directa. 50 μ l + 1.0 ml. Rango de 50 a 200 mg/dl.

	MC	F	R ²	a	b
REGRESION	25865	2084.1	0.99809	1.05286	-5.0
ERROR REGRESION	12.41	2.08 x10 ⁻⁴		1.1168	3.4705
FALTA DE AJUSTE	24.11	2.837			
ERROR EXP.	8.5	0.1868		0.9888	-13.47

1.- La P(F) es menor que 0.05 por lo tanto el método es lineal.

2.- La P(F)A es mayor que 0.05 (0.1868) por lo tanto no hay falta de ajuste.

3.- El rango de "m" incluye cero, no hay error proporcional consistente.

4.- El rango de "b" incluye cero por lo que tampoco existe error proporcional constante.

5.- El método está validado de 50 a 200 mg/dl.

2.2.1. Urea. Cinética. 25 mcl + 0.5 ml. rango de 30 a 80 mg/dl.

	MC	F	R2	m	b
REGRESION	3110.9	653.9	0.9909	1.010	1.22
ERROR REGRESION	4.756	3.18 x10 ⁻⁵		1.107	7.500
FALTA DE AJUSTE	0.082	0.0143			
ERROR EXP.	5.7	0.9968		0.9137	-5.045

- 1.- La P(F) es menor que 0.05 por lo tanto el fenómeno es lineal.
- 2.- La P(F/A) es mayor a 0.05 (0.9968) por lo tanto no hay falta de ajuste.
- 3.- El rango de "m" abarca uno, no hay error proporcional consistente.
- 4.- El rango de "b" incluye cero, por lo que no hay error proporcional contante.
- 5.- El método esta validado para urea en un rango de 30 a 80 mg/dl.

3.1.1. Creatinina. 100 mcl + 1.0 ml. Rango de 1.2 a 24.0 mg/dl.

	MC	F	R2	m	b
REGRESION	812.13	881.01	0.98546	0.89289	0.7629
ERROR REGRESION	0.9218	1.75 x10 ⁻⁷		0.9578	1.567
FALTA DE AJUSTE	2.223	4.185			
ERROR EXP.	0.5313	0.03653		0.8279	-0.041

Se observa que se cumplen los puntos 1 y 2 (usando el valor de R2) pero el rango de "m" no incluye uno, lo cual habla de error proporcional consistente. No existe linealidad en 24 mg/dl, en este caso no sólo puede ser la sensibilidad del reactivo, sino la temperatura a la cual se verifico la reacción, incluso también a esta concentración pudo ser necesario mayor tiempo de reacción, se repite el análisis en el rango de 1.2 a 12 mg/dl.

3.1.1. Creatinina. 100 mcl + 1.0 ml. Rango de 1.2 a 12.0 mg/dl.

	MC	F	R2	m	b
REGRESION	224.69	1185.18	0.99163	1.0554	0.008
ERROR REGRESION	0.189	7.7 x10 ⁻⁷		1.123	0.480
FALTA DE AJUSTE	0.0113	0.0484			
ERROR EXP.	0.2341	0.9945		0.987	-0.462

- 1.- La P(F) es menor que 0.05 y entonces el fenómeno es lineal.
- 2.- La P(F)A es de 0.9945 que es mayor de 0.05, tampoco hay falta de ajuste.
- 3.- No existe error proporcional consistente puesto que el intervalo de "m" incluye uno.
- 4.- Tampoco hay error proporcional constante ya que el intervalo de "b" incluye cero.
- 5.- El método para creatinina esta validado en el rango de 1.2 a 12.0 mg/dl.

3.1.2. Creatinina. 100 mcl + 1.0 ml. Rango 1.2 a 24.0 mg/dl.

	MC	F	R2	m	b
REGRESION	180.95	3261.9	0.99816	1.160	-0.174
ERROR REGRESION	0.0554	1.4 x10 ⁻⁵		1.209	0.517
FALTA DE AJUSTE	0.039	0.6117			
ERROR EXP.	0.063	0.5885		1.110	-0.168

Los puntos 1 y 2 se cumplen satisfactoriamente, pero el rango de "m" no incluye uno, lo cual indica un error proporcional consistente, igual que en el caso anterior, el hacer la lectura a una temperatura mayor (dos grados) no modifica los resultados, no hay linealidad hasta 24 mg/dl, lo cual puede deberse a las causas mencionadas anteriormente,, sobre todo a la posible inestabilidad del compuesto formado debido a falta de tiempo de reacción. Se repite el análisis esta vez sólo hasta 6.0 mg/dl.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

3.1.2. Creatinina. 100 mc1 + 1.0 ml. Rango de 1.2 a 6.0 mg/dl.

	MC	F	R2	m	b
REGRESION	29.49	487.79	0.99186	1.119	0.292
ERROR REGRESION	0.060	4.0 x10 ⁻⁴		1.26	0.845
FALTA DE AJUSTE	0.0319	0.4563			
ERROR EXP.	0.07	0.5497		0.979	-0.261

1.- La P(F) es menor a 0.05, el método es lineal.

2.- La P(F)A es de 0.5497 (mayor a 0.05), por lo tanto no hay falta de ajuste.

3.- El rango de "m" incluye uno, lo que elimina un error proporcional consistente.

4.- El rango de "b" incluye cero, por lo que no hay error proporcional constante.

5.- El método para creatinina esta validado en un rango de 1.2 a 6.0 mg/dl.

4.1.1. Colesterol. Punto Final. 25 mc1 + 0.5 ml. Rango de 100 a 400 mg/dl.

	MC	F	R2	m	b
REGRESION	95193.8	806.14	0.98896	0.8710	15.65
ERROR REGRESION	119.08	2.09 x 10 ⁻⁶		0.94084	33.65
FALTA DE AJUSTE	186.12	1.886			
ERROR EXP.	98.66	0.2209		0.816	-2.34

El punto 1 y 2 se cumplen satisfactoriamente, pero al igual que varias técnicas anteriores existe un error proporcional consistente, m no abarca 1, se pueden pensar en varias causas para este fenómeno:

- saturación de la enzima con el valor relativamente alto de sustrato,
- posible degradación del reactivo,
- posibles errores en la medición.

Para este método se estudió la linealidad ahora en el rango de 100 a 300 mg/dl encontrándose los siguientes resultados:

	MC	F	R2	m	b
REGRESION	41500	669.26	0.9896	0.8316	22.22
ERROR REGRESION	62.00	1.2 X10 ⁻⁵		0.9076	38.64
FALTA DE AJUSTE	193.54	4.825			
ERROR EXP.	40.111	.0069		0.7556	5.8

En este nuevo ensayo se detectó error proporcional consistente.

4.1.2. Colesterol. Punto Final. 50 mcl + 0.5 ml rango de 100 a 400 mg/dl.

En este método se encontró linealidad, no hay falta de ajuste y existe error proporcional consistente de acuerdo a los siguientes datos:

	MC	F	R2	m	b
REGRESION	137664	2951	0.99662	0.958	6
ERROR REGRESION	46.64	4.4 X10 ⁻⁷		0.997	16.75
FALTA DE AJUSTE	19.2	0.357			
ERROR EXP.	53.5	0.715		0.9187	-4.759

En esta técnica se analizaron estadísticamente todos los valores para encontrar el rango de linealidad del método de medición, sin embargo la presencia de error consistente ocurrió por la presencia de resultado "aberrante", por lo que al eliminarlo, el rango de linealidad sin error proporcional consistente estimado por regresión se da entre los límites estudiados.

	MC	F	R2	m	b
REGRESION	541494	1162.7	0.99402	0.95	7.33
ERROR REGRESION	46.57	8.2 X10 ⁻⁶		1.01	21.56
FALTA DE AJUSTE	32.03	0.6537			
ERROR EXP.	49	0.5458		0.884	-6.89

Para proteínas totales este ensayo estadístico no fue posible realizarlo debido a que para fines de cálculo con dos puntos se obtiene un matriz singular que no permite estimar efectos.

X CONCLUSIONES

X.- CONCLUSIONES.

Las microtécnicas son una forma de economía en cuanto a muestra, reactivos, material y tiempo. Es posible utilizar muy poca cantidad de suero para varias determinaciones, en general se pudo trabajar con 250 microlitros de suero diluido 1:10 y 100 microlitros de suero directo para cinco determinaciones.

Estas técnicas demostraron exactitud y precisión sin tener que trabajar con equipo automatizado. Se considera que el equipo utilizado es muy adecuado para laboratorios pequeños y regulares (aprox. de 15 a 20 muestras por día) por su fácil manejo, mantenimiento y versatilidad (además de que existen sus análogos en otras marcas).

Observamos que la forma más apropiada para disminuir una técnica en cada procedimiento es comenzar al final y trabajar hacia atrás, es decir en primer lugar debemos resolver a que volumen final de muestra reactivo hay que llegar, el cual dependerá obviamente del volumen de la cubeta más pequeña disponible en el espectrofotómetro y elegir la determinación colorimétrica, enzimática, etc. más accesible a cada presupuesto y ensayar los diferentes volúmenes de muestra-reactivo, de acuerdo a las condiciones de nuestro equipo y de los instrumentos de medición. Se puede decir que el equipo que nos proporcione reproducibilidad de datos es aceptable y confiable para trabajar.

Como también se observó, aunque no se reportó a lo largo del trabajo la dilución 1:10 es la más adecuada (otra dilución ensayada fue 1:20), aún así el volumen de muestra con que se puede trabajar es muy pequeño. Excepto para creatinina que utiliza un volumen mínimo de 100 microlitros de suero sin diluir para las demás técnicas puede decirse que se alcanzan ambos objetivos, encontrar un método que utilice una pequeña cantidad de muestra y validarlo para su uso confiable. Tal vez para creatinina haya que hacer varias modificaciones al reactivo y ensayar con diferentes temperaturas y tiempo de reposo para conseguir disminuir el volumen de muestra y poder hablar de una microtécnica.

Puede decirse también que al obtener técnicas rápidas y precisas esta metodología sirve de apoyo para equipos altamente sofisticados (en un laboratorio que posee equipos automáticos se produce un caos al descomponerse uno de estos debido al gran número de muestras) ya que cada determinación puede hacerse en pocos minutos a comparación de las técnicas manuales. También estos procedimientos pueden usarse para pruebas de gabinete, las cuales son un número pequeño en cantidad, pero requieren resultados rápidos.

XI RECOMENDACIONES

XI.- RECOMENDACIONES.

Para finalizar se hacen algunas recomendaciones sobre este trabajo en forma breve:

Los procedimientos hechos en este trabajo pueden ensayarse en otros líquidos corporales como plasma, orina y líquido cefalorraquídeo, ya que muchas veces es necesario el conocimiento de su valor en un momento de urgencia y por lo tanto una técnica rápida es de gran utilidad.

Además puede verificarse el ensayo de enzimas, determinaciones que son necesarias en muchos perfiles bioquímicos importantes como es el perfil cardíaco (LDH, TGO), el perfil hepático (transaminasas y fosfatasa alcalina), etc.

Existen muchos equipos similares al usado en este trabajo (semiautomático) que pueden utilizarse para lograr una metodología más rápida y barata que un equipo manual (cuyo volumen mínimo de celda de flujo es de 1.0 ml a comparación de 0.5 ml en el caso de los equipos semiautomáticos conocidos).

XII BIBLIOGRAFIA

XII.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Natelson, Samuel, "Microtechniques of Clinical Chemistry". Charles Thomas Publisher. 2nd. edition. 1961. U.S.A.
- 2.- Davidsohn, I. Henry, J., "Diagnóstico Clínico por el laboratorio". Ed. Salvat. 5a. edición. 1979. España.
- 3.- Frings, S., Christopher, "Clinical Chemistry Procedures of Medical Laboratory Associates". A Damon Laboratory Publication. 3th. edition. 1971. U.S.A.
- 4.- Henry, R.J., "Clinical Chemistry: Principles and Technics". Harper & Row Publishers. 1974, New York, U.S.A.
- 5.- Hawk, P.B., et al., "Practical Physiological Chemistry" Mc Graw-Hill. 1954. New York, U.S.A.
- 6.- Day, H.G. Bernstorff, et al: Anal.Chem. 21:1290, 1949.
- 7.- Gornall, A. G., et al. J. Biol. Chem., 177:751, 1949.
- 8.- Lehninger, Albert. "Bioquímica". Ed. Omega. 2a. edición. 1979. España.
- 9.- Ander, Paul y Sonessa, Anthony. "Principios de Química". Ed. Limusa. 1a. edición. 1977. México.
- 10.- Busch, H. Rodolf. "Química de los compuestos de coordinación". Ed. Reverté. 1976. España.
- 11.- Norbert, W. Tietz. "Fundamental of Clinical Chemistry". W.B. Saunder Company. 1976. U.S.A.
- 12.- Manual de técnicas. Farmacéuticos Lakeside. Mannheim Boehringer. 1984. España.
- 13.- Manual Merck. Diagnóstico Clínico. 1980. México.
- 14.- Diabetes en las noticias. Div. Ames. Laboratorios Miles. 1987. México.
- 15.- Siedel, J.H., J. clin. Chem. Biochem. 19 (1981). 838.
- 16.- Chaney, A.L. y Marbach, E.P. 1962. "Modified reagents for determination of urea and ammonia". Clin. Chem. B (2): 130-32.
- 17.- Actualidades Diagnósticas 6. Publicación de Boehringer Mannheim 1980. España.
- 18.- Hamlin, W.B., et al. "Laboratory Instrument Maintenance Manual". College of American Pathologists". 1977. U.S.A.

- 19.-Sakaguchi, S.: Japan Med. J. 1:278, 1948.
- 20.-Annino, S. Joseph., Giese, W., Roger. "Clinical Chemistry: Principles and Procedures". Little Brown & Co. 4th edition. 1976. Boston. U.S.A.
- 21.-Curtius, H. Ch., and Roth, Marc. "Clinical Biochemistry: Principles and Methods". Vol. 1. Ed. Walter de Gruyter. Berlin, Alemania. 1974.
- 22.-Meites, S. Taluker. "Manual of Practical Micro and general Procedures in Clinical Chemistry". Thomas Springfield, Illinois. 1962.
- 23.-Mattenheimer, H. "Micromethods for the Clinical and Biochemical Laboratory". Ann Arbor Sciences Publishers. Inc. Michigan. 1970.
- 24.-Frankel, Sam., Reitman, Stanley., et al. "Grandwhol's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis". The C.U. Mosby Company. 7a. edición. Londres. Vol I.
- 25.-Folin, O., J. Biol. Chem., 82:83. 1929; 86:173, 1930.
- 26.-Hultman, E., "Rapid specific method for determination of aidosaccharides in body fliuds". Nature, 183. 108-109. 1959.
- 27.-Dubowsky, K.M., 1962. "An O-toluidine method for body fluid glucose determination"., Clin. Chem. 8:215-235.
- 28.-Akiji, F., and Iwatake, D.: Biochem. Z., 242:43., 1932.
- 29.-Werner, W., H.G. Rey., et al., Z. Analyt. Chem. 252 (1970).
- 30.-Van Slyke, D.D. and Cullen, G.E.: J. Biol. Chem., 11:211, 1914.
- 31.-Karr, W.G., J. Lab. and Clin. Med. 9:329, 1924.
- 32.-Natelson, A., Scott. M.L., and Beffa, C. : Am. J. Clin. Path. 21, 275. 1951.
- 33.-Talke, H., and Schubert, G.E., Klinische Wochenschrift. 43, 174 (1965).
- 34.-Manual Beckman. Scientific Instrument division. 1981. U.S.A.
- 35.-Jaffe, M.:Z. Physiol. Chem., 10. 391.1886.
- 36.-Bonsnes, R.W., y Taussky, H.H.:J. Biol. Chem., 158:581, 1945.
- 37.-Borsok, H.:J. Biol. Chem., 110:481, 1935.
- 38.-Moss, G. A., et al. Clin. Chem. 20:871. 1974. Abstracts 88 y 89.
- 40.-Allison, M.J.C.:J. Biol. Chem., 157:169, 1945.

- 41.-Mayes, P.: Lipids, In Harper, H.A. (ed): review of Physiological Chemistry. 13th. edition. Los Altos, California. Lange Medical Publications, 1971.
- 42.-Zlatkis, A., Zak, B., et al.: A new method for the direct determination of cholesterol. J. Lab. Clin. Med. 41:486. 1953.
- 43.-Allain, C.C., Poon, L. et al. Clinical chemistry 20, 470 (1974).
- 44.-Huang, T.C. A stable reagent for the Liebermann-Buchard reaction. Application to rapid serum cholesterol determination. Analytical Chem. 33 1405. 1961.
- 45.-Weichselbaum. T.E., American Journal of Clinical Pathology (Technical section) 16, 40 (1946).
- 46.-Kunkel, H.G. and Ward, S.M.: J. Biol. Chem., 182:597, 1950.
- 47.-Greenberg, D.M.: J. Biol. Chem., 82:545, 1929.
- 48.-Nauman, H.N.: "Determination of total serum proteins by refractometry". Sunderman eds. Philadelphia, J.B. Lippincott Co., 1964.