

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**Efecto de leucocitosis y tiempo de análisis de las muestras sanguíneas
sobre las concentraciones de glucosa, bicarbonato y ácido láctico en
perros**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

MORALES OLEA MAURICIO RENÉ

Asesores:

Dr. Jan Bouda

Dr. Luis Núñez Ochoa

México D.F.

2009



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.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DEDICATORIAS

A mi abuela Guadalupe Olea Garns y a mi madre Laura R. Morales Olea. Este logro es tan suyo como mío por la formación y el apoyo que siempre me han brindado.

A mi hermana Raquel y a mi sobrino David, que me dan alegría todos los días y me impulsan a seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia.

Al Dr. Jan Bouda y al Dr. Luis Núñez Ochoa por toda la paciencia que me tuvieron durante la realización de este trabajo.

A mis amigos Sofía, Fernanda y Manuel. Sin ustedes yo no estaría donde me encuentro en estos momentos.

A Octavio, Lili, Javier, Vero, Itzel, Erla, Rodrigo y Toño que fueron una parte decisiva en mi vida y me dieron toda la orientación y la confianza.

A mis compañeros de estancia de Patología Clínica que me han apoyado y han estado conmigo cuando más los he necesitado.

ÍNDICE

Resumen	5
Introducción	6
Hipótesis	10
Objetivo	10
Material y métodos	11
Resultados	14
Discusión	23
Conclusiones	26
Literatura citada	27

MORALES OLEA MAURICIO RENÉ. **Efecto de leucocitosis y tiempo de análisis de las muestras sanguíneas sobre las concentraciones de glucosa, bicarbonato y ácido láctico en perros** (bajo la supervisión de Dr. Jan Bouda y Dr. Luis Núñez Ochoa).

Introducción

La colección de muestras debe reunir condiciones apropiadas y específicas para prevenir cambios en las concentraciones de ciertos analitos posteriores a la obtención de la misma, entre ellos la glucosa, el lactato y el bicarbonato. Diversos estudios se han hecho sobre la influencia de la temperatura ambiental, el tipo de muestra y relación sangre/anticoagulante en varias especies.^{1,2} El número de leucocitos es un factor que no ha sido propiamente estudiado, haciendo énfasis en casos de leucocitosis por lo que es necesario conocer el impacto de éste. En pacientes humanos con distintos grados de leucocitosis, o por algunos tipos de leucemia presentan hipoglucemia relacionada a la aquella y es independiente de la línea celular que se encuentre incrementada.³

La glucosa es el principal recurso de las células para satisfacer sus requerimientos energéticos, el 90% es metabolizada por medio de la glucólisis, produciendo lactato en un ambiente anaerobio.⁴ La concentración de glucosa en sangre es anormal en muchas enfermedades, por lo que la hipoglucemia es un hallazgo común en el laboratorio. Se ha demostrado en humanos que una cuenta elevada de leucocitos puede producir disminución en la glucemia.^{5,6} Sin embargo, la tasa de actividad glucolítica es variable, y tienen que ver algunos aspectos, como la especie (las células de suinos y bovinos tienen glucólisis más lenta que las de perros y humanos⁷), el equilibrio ácido-base sanguíneo o la temperatura a la que estén expuestas las muestras.⁸ Varios compuestos han sido empleados como aditivos para inhibir la glucólisis, como el fluoruro de sodio que si bien ha probado ser efectivo, la desventaja que presenta es que sólo inhibe el proceso de glucólisis pasadas 2 ó 3 horas (mientras tanto la vía metabólica se lleva a

cabo con normalidad),⁹ o la manosa, la cual puede causar interferencia en la determinación de glucosa bajo ciertos métodos enzimáticos.^{10, 11} En la clínica de pequeñas especies la hipoglucemia es un hallazgo importante que puede ser indicativo de varios padecimientos como: sepsis, enfermedad hepática, neoplasias (insulinoma, tumores productores de sustancias similares a la insulina), etc.; aunque se debe relacionar con resultados de otros analitos; cuando se encuentra como único cambio y de forma persistente puede ser de importancia clínica.¹²

El ácido láctico (L-lactato) es un producto de la glucólisis anaeróbica, se transporta afuera de las células por medio de transportadores de membrana hacia el torrente sanguíneo y es ahí donde algunas células que poseen gran capacidad oxidativa lo pueden reutilizar para convertirlo nuevamente en ATP. La hiperlactatemia es el resultado de un desbalance entre la producción y utilización del lactato por un aumento en la glucólisis en un ambiente aerobio, disminución en la perfusión de los tejidos (en ausencia de oxígeno), o una disminución en su metabolismo por parte del hígado y los riñones.¹³

La determinación de lactato es una práctica común en la medicina veterinaria para evaluar algunos factores, como el desempeño durante el ejercicio, o proporcionar información de la severidad y del pronóstico de varios aspectos médicos y quirúrgicos.¹⁴ Así, las pérdidas de glucosa y el incremento de lactato en las muestras sanguíneas pueden atribuirse al metabolismo celular, o bien, a una probable contaminación bacteriana, incluso algunos agentes patógenos como la babesiosis (en estados muy avanzados) pueden provocar hipoglucemia e hiperlactatemia.¹⁵

El bicarbonato se encarga de mantener el pH sanguíneo dentro de valores de referencia, la disminución de bicarbonato trae en consecuencia la disminución del pH, que indica acidemia y que es causada por una acidosis, como en la cetoacidosis diabética o la

acidosis láctica.¹⁶ El bicarbonato forma en conjunto con el ácido carbónico el sistema amortiguador de sangre más importante, el cual contribuye con más de 65% en la capacidad total de amortiguación, mientras que el resto de los componentes contribuyen con sólo 35%.¹⁷ El metabolismo genera normalmente iones hidrógeno que deben ser amortiguados en condiciones de homeostasis,¹⁸ mientras que la concentración de bicarbonato se ve significativamente afectada tanto por el ejercicio como por la temperatura ambiental, ya sea como factores separados o bien, en conjunto.¹⁹

Otros sistemas que controlan el pH sanguíneo son los mecanismos de compensación pulmonares y renales, los cuales se basan en la eliminación de CO₂ o el intercambio de iones K⁺/H⁺ para de esta manera tratar de aminorar los efectos nocivos que conllevan un desequilibrio.²⁰

En humanos se ha observado que al tomar muestras sanguíneas, el bicarbonato desciende si el suero no es separado del coágulo en las primeras dos horas. Esto sucede a una temperatura constante, es decir, si el manejo de la muestra no es el adecuado, podemos tener disminuciones del bicarbonato, lo cual se refleja de manera secundaria en el incremento de los ácidos no volátiles (anion gap).

La determinación del CO₂ total por espectrofotometría proporciona un estimado de la concentración del bicarbonato en suero, pues representa el 95% y el ácido carbónico con el CO₂ disuelto representan sólo el 5% de CO₂ total, por lo tanto, se puede utilizar para evaluar trastornos metabólicos del estado ácido-base del paciente cuando no es posible determinar equilibrio ácido base completo (pH, pCO₂ y bicarbonato).

En la clínica de pequeñas especies los desajustes en el pH son comunes por diversos problemas como vómito, diarrea, deshidratación, alteraciones de aparato respiratorio, anestesia durante un proceso quirúrgico, incluso secundario a la administración de algunos fármacos como la enrofloxacin.²²

RESUMEN

La colección y manejo de muestras sanguíneas debe reunir condiciones apropiadas para prevenir cambios en ciertos analitos. El objetivo del estudio fue determinar los cambios y su magnitud, en valores de glucosa, ácido láctico y equilibrio ácido-base en plasma y suero provenientes de sangre venosa de perros con leucocitosis en diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento posteriores a la obtención de la muestra. Las muestras fueron obtenidas de vena yugular de 10 perros con leucocitosis ($22.4 \times 10^9/L$) a las cuales se les aplicaron tres distintos tratamientos: A) sangre heparinizada mantenida a 4 °C, B) suero sin separar el coágulo almacenado a 4 °C; C) suero sin separar del coágulo incubado a 22 °C. Se realizaron centrifugaciones de sangre heparinizada y de sangre coagulada y se determinaron en plasma y suero, respectivamente, concentraciones de glucosa, ácido láctico, bicarbonato, sodio, cloro, potasio y se calculó la diferencia de iones fuertes. En A y B se determinaron los analitos a 15 min (sólo A), 1 h, 3 h, 6 h, 12 h y 24 h, mientras que en C sólo a las 3 h y 6 h posteriores a la toma de la muestra. El análisis de resultados se realizó mediante análisis de varianza de mediciones repetidas, sólo hubo diferencias significativas al compararse los 3 distintos manejos, en plasma de sangre heparinizada (A) se encontraron cambios significativos ($p < 0.05$) en glucosa y ácido láctico a partir de las 12 h; en suero en contacto con el coágulo almacenado a 4 °C los cambios fueron significativos a partir de las 6 h; en suero en contacto con el coágulo incubado a 22 °C en 3 h posteriores a la toma de muestra. La disminución de glucosa (mmol/L) en distintos tiempos de análisis correspondió al mismo incremento de ácido láctico (mmol/L). Para evitar consumo in vitro de la glucosa y el aumento de ácido láctico, se sugiere obtener muestra de sangre con heparina y analizar el plasma dentro de las primeras 12 h; en suero con coágulo mantenido a 4 °C es necesario analizar dentro de 6 h después de la obtención de la muestra.

Hipótesis

- a) La concentración de glucosa disminuirá gradualmente a través del tiempo en relación proporcional al número de leucocitos que contenga la muestra.
- b) El ácido láctico aumentará su concentración gradualmente en las muestras a través del tiempo y guardará relación con el número de leucocitos en las muestras.
- c) El CO₂ total (bicarbonato) no guardará relación con el número de leucocitos en la muestra pero disminuirá su concentración con el paso del tiempo, con lo que los valores ácido-base (anión gap) también se verán modificados.

Objetivo

Determinar los cambios y la magnitud en valores de glucosa, lactato y equilibrio ácido-base en plasma y suero provenientes de sangre venosa de perros con leucocitosis en diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento posteriores a la obtención de la muestra.

Material y Métodos

En el presente estudio se utilizaron 10 perros adultos los cuales presentaron leucocitosis determinada previamente mediante la realización de un hemograma. No se consideró el género o la raza de éstos como criterio de inclusión. De los 10 perros que fueron muestreados el 50% fueron machos, mientras que el 50% restante hembras; el peso corporal en promedio fue de 19.9 kg (12.2 - 25.3 kg).

Las muestras fueron tomadas de la vena yugular, rasurando y limpiando previamente el área a puncionar con una torunda de algodón con alcohol, presionando por no más de diez segundos. La cantidad de sangre que se le extrajo a cada perro fue de aproximadamente 33 mL. Con relación al peso corporal y al volumen sanguíneo no representa ningún peligro y pudo sustraerse de forma segura para los animales.^{23, 24} Se descartaron muestras con presencia de hemólisis y lipemia.

A cada perro se le realizó un hemograma de forma manual tomando la muestra de sangre venosa en un tubo con EDTA (1.0 mL), el cual consistió en determinación de hematocrito, conteo de eritrocitos y leucocitos, estimación de plaquetas, conteo diferencial de leucocitos y determinación de sólidos totales de acuerdo a procedimientos manuales estandarizados.²⁵

Las muestras sanguíneas para su evaluación fueron divididas en tres grupos:

- A) Plasma de sangre heparinizada con heparina de sodio a temperatura de 4 °C.
- B) Suero de sangre a temperatura de 4 °C.
- C) Mediciones en suero de sangre sin anticoagulante e incubada a 22 °C.

Para la parte A se tomaron 10 mL de sangre en una jeringa heparinizada con heparina sódica (5,000 UI/mL). La heparinización de la jeringa se efectuó mediante aspirado de la solución de heparina y expulsión de la jeringa a su recipiente. La cantidad que resta en el espacio muerto de la jeringa es suficiente para anticoagular 10 mL de sangre.

Además dentro de la jeringa se introdujo una perla de vidrio para permitir el correcto homogenizado de la muestra y el anticoagulante. Una vez llena la jeringa con sangre heparinizada y sin burbujas se colocó un tapón de goma en la punta de la aguja y se introdujo en un recipiente con agua y hielo. Para centrifugar la sangre se retiró de la jeringa 1 mL, se transfirió a un tubo Eppendorf y se centrifugó a 2,400 g durante 5 minutos en una microcentrífuga Eppendorf para la obtención de plasma. En el plasma se determinaron las concentraciones de glucosa, lactato, bicarbonato (CO₂ total) y electrolitos. El resto de la muestra, se utilizó la sangre entera y se centrifugó a los 15 min, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, y 24 h posteriores a la toma de la muestra para realizar las mismas determinaciones.

En la parte B del estudio la sangre fue tomada en 5 tubos con vacío (Vacutainer®) sin anticoagulante con capacidad de 3 mL, y se llenaron al límite de su capacidad. Todos los tubos se mantuvieron 60 min a temperatura de laboratorio para favorecer la coagulación y la retracción del coágulo. Posteriormente, un tubo se centrifugó a 1,200 g por 10 min e inmediatamente se determinaron los mismos analitos. Los tubos restantes se mantuvieron en refrigeración (4 °C) hasta el momento de centrifugar y realizar mediciones a las 3 h, 6 h, 12 h y 24 h.

Para la parte C del estudio, las muestras fueron tomadas en 2 tubos sin anticoagulante con vacío (Vacutainer®) y mantenidas a temperatura ambiente durante la primera hora. Posteriormente se colocaron los tubos en un baño maría a 22 °C y se realizaron centrifugaciones y determinaciones a las 3 h y 6 h posteriores al momento de la toma de muestra.

Las concentraciones de glucosa, bicarbonato y lactato en el suero o plasma se determinaron con un espectrofotómetro semiautomatizado Selectra Junior® (Holanda). Para medición de glucosa se utilizó una modificación del método de

glucosa/peroxidasa²⁶, el método de lactato/oxidasa²⁷ para el lactato y para el bicarbonato se utilizó carboxilasa de fosfoenolpiruvato. Los electrólitos (Na, Cl y K) se determinaron en un analizador ión selectivo marca Easy Lite® . Todos los estudios bioquímicos y hemogramas se realizaron en el Laboratorio de Patología Clínica del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Análisis estadístico

Las determinaciones de glucosa y ácido láctico fueron evaluadas mediante un análisis de varianza para un diseño de muestras repetidas, por medio del modelo lineal general en el programa SPSS versión 10.0 para Windows® con el fin de comparar diferencias entre tratamientos y tiempos de análisis.

Resultados

Determinación de leucocitosis

La leucocitosis, neutrofilia y eosinofilia se presentaron en todos los perros (100%). Un perro presentó linfopenia, uno linfocitosis, uno monocitosis (cuadro 1).

Cuadro 1.

VALORES HEMATOLÓGICOS EN PERROS CON LEUCOCITOSIS (n = 10)

No. animal	Leu	Neut	Linf	Eos	Mono	Plaq	Ht	PT
	(x10 ⁹ /L)						(L/L)	(g/L)
1	19.6	15.7	0.8	2.7	0.4	320	0.49	75
2	18.6	13.9	2.9	1.6	0.2	252	0.41	76
3	20.6	12.0	4.9	2.8	0.9	248	0.34	75
4	25.6	15.8	1.6	2.3	0.3	293	0.45	82
5	23.2	16.3	3.7	3.2	0	220	0.38	70
6	22.1	17.7	1.5	2.9	0	248	0.45	66
7	22.3	15.8	3.1	2.3	0.1	Cúmulos	0.33	70
8	30.8	20.7	7.3	1.3	1.5	366	0.42	77
9	22.9	16.0	3.9	2.8	0	400	0.41	72
10	18.1	14.6	2.2	1.1	0.2	Cúmulos	0.28	86
Promedio:	22.38	15.8	3.19	2.3	0.4	-	0.39	75

Referencia: 6.0 - 17.0 3.0 - 11.5 1.0 - 4.8 0.1 - 0.9 0.1 - 1.4 300 - 800 0.37 - 0.55 60 - 75

Leu = leucocitos, Neut = neutrófilos, Linf = linfocitos, Eos = eosinófilos, Mono = monocitos, Plaq = plaquetas, Ht = hematócrito, PT = proteínas totales.

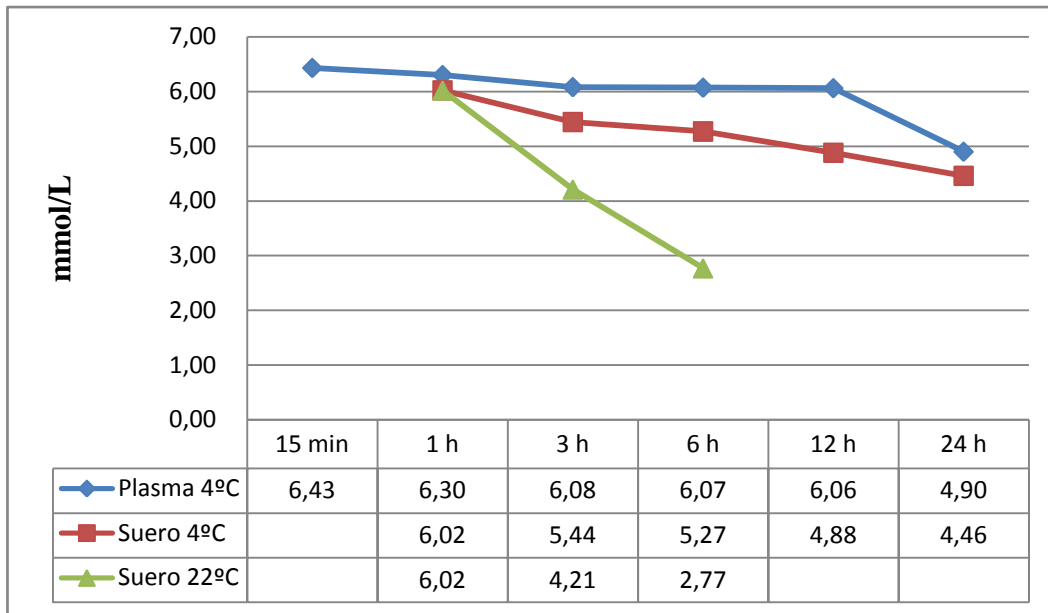
Glucosa

La concentración de glucosa tuvo un descenso significativo ($P < 0.05$) a los 15 min, 24 h y 1 h a 24 h en el plasma de sangre heparinizada (cuadro 2). No hubo cambios significativos en las concentraciones de glucosa en de las primeras 12 h posteriores a la primera toma de muestra de sangre heparinizada. El resto de los tratamientos tuvo diferencias significativas como se muestran en el cuadro 3. El valor de glucosa en plasma de sangre heparinizada a 4 °C descendió durante 12 h en promedio un 6% (0.37 mmol/L), aproximadamente 0.5% cada hora, mientras que en suero en contacto con coágulo a 4 °C un 25% (1.97 mmol/L) que corresponde a un 2.08%/hora; en contraste,

el suero con coágulo que se incubó a 22°C mostró un descenso de 1.44 mmol/L (35.2%) en sólo 3 horas, aproximadamente 11.7% cada hora (gráfica 1).

Gráfica 1.

DINÁMICA DE LA GLUCOSA EN PLASMA DE SANGRE HEPARINIZADA ALMACENADA A 4 °C, EN SUERO EN CONTACTO CON COÁGULO ALMACENADO A 4 °C Y A 22 °C



Cuadro 2.

SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA DE CAMBIO EN CONCENTRACIONES DE GLUCOSA EN PLASMA DE SANGRE HEPARINIZADA (A)

Tratamiento	Tiempo	Tiempo	Error Estándar	Valor t	P
A	15 min	24 h	0.4427	3.29	0.0280
A	1 h	24 h	0.4309	3.19	0.0371

Cuadro 3.

COMPARACIÓN DE LAS DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE
SIGNIFICATIVAS DE LOS 3 TRATAMIENTOS (A, B Y C) EN LA MEDICIÓN DE
GLUCOSA

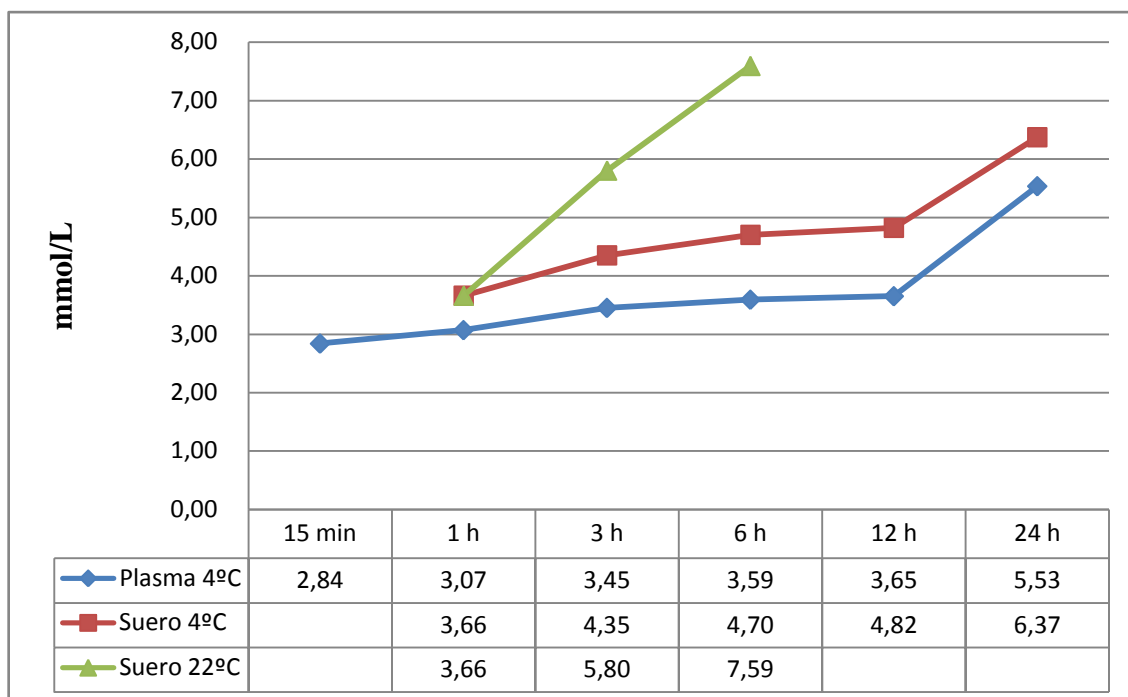
Tratamiento	Tiempo	Tratamiento	Tiempo	P
A	3 h	C	3 h	< 0.0001
A	3 h	C	6 h	< 0.0001
A	6 h	C	3 h	< 0.0001
A	6 h	C	6 h	< 0.0001
B	3 h	C	3 h	0.0018
B	3 h	C	6 h	< 0.0001
B	6 h	C	3 h	0.0094
B	6 h	C	6 h	< 0.0001
C	3 h	C	6 h	0.0002

Ácido láctico

En los valores de las concentraciones de ácido láctico se observó un incremento en los tres tratamientos que se aplicaron (gráfica 2). Se incrementó en el plasma de sangre heparinizada a 4 °C aproximadamente un 28% (0.81 mmol/L) en las primeras 12 h, alrededor de 2.3% /cada hora, mientras que en el suero en contacto con el coágulo mantenido a 4 °C fue del 69% (1.68 mmol/L) en el mismo lapso de tiempo (5.75%/ cada hora) y en el suero con coágulo a 22 °C de 30.8% en sólo tres horas, lo que correspondería a aproximadamente a 1.79 mmol/L en ese lapso de tiempo (un 10.2% cada hora). En el análisis estadístico las diferencias significativas que mostró fueron comparando las mediciones de 15 minutos y 1 hora con las de 24 horas (cuadro 3); el resto de las observaciones al comparar los efectos de los tratamientos se observan en el cuadro 4.

Gráfica 2.

DINÁMICA DE ÁCIDO LÁCTICO EN PLASMA DE SANGRE HEPARINIZADA A 4 °C, EN SUERO EN CONTACTO CON COÁGULO ALMACENADO A 4 °C Y A 22 °C



Cuadro 4.

DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS EN DISMINUCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO EN PLASMA DE SANGRE HEPARINIZADA Y MANTENIDA A 4 °C

Tratamiento	Tiempo	Tiempo	Error estándar	Valor t	P
A	15 min	24 h	0.6320	-4.09	0.0024
A	1 h	24 h	0.6152	-4.00	0.0032
A	3 h	24 h	0.6152	-3.39	0.0211

Cuadro 5.

COMPARACIÓN DE CONCENTRACIONES DE ÁCIDO LÁCTICO EN LOS TRES
DISTINTOS MANEJOS Y TEMPERATURAS DE ALMACÉN A TRAVÉS DEL
TIEMPO

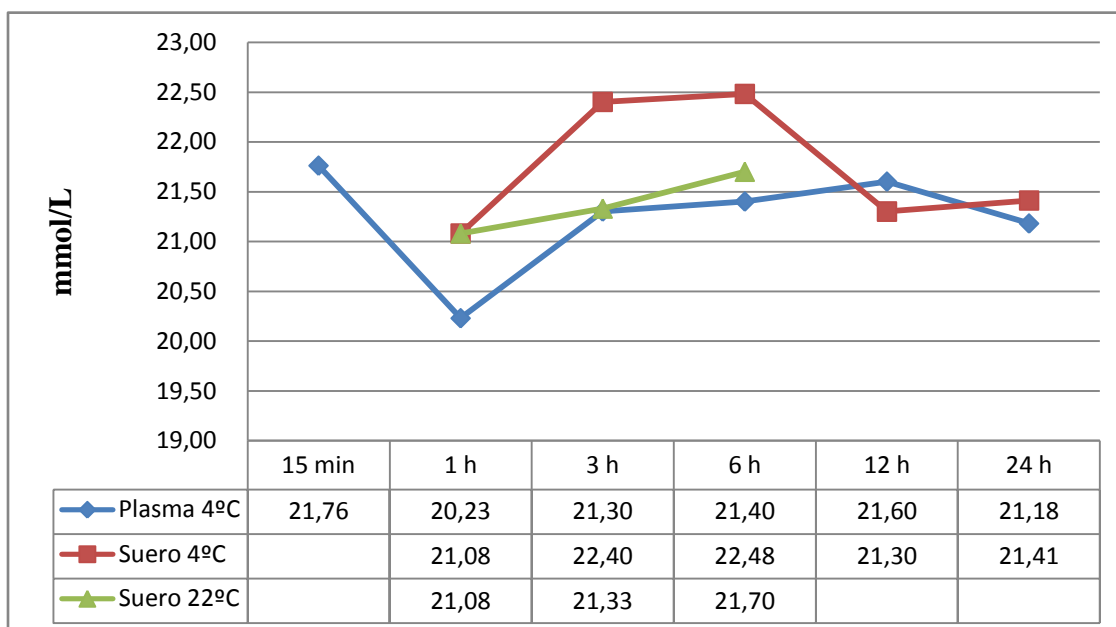
Tratamiento	Tiempo	Tratamiento	Tiempo	P
A	3 h	B	6 h	0.0337
A	3 h	C	3 h	<0.0001
A	3 h	C	6 h	<0.0001
A	6 h	C	3 h	<0.0001
A	6 h	C	6 h	<0.0001
B	3 h	C	3 h	0.0236
B	3 h	C	6 h	<0.0001
B	6 h	C	6 h	<0.0001
C	3 h	C	6 h	0.0023

CO₂ total

El CO₂ total (bicarbonato) presentó variaciones erráticas en los 3 tratamientos y en los distintos tiempos de medición (gráfica 3). La concentración de este analito aumentaba y disminuía sin conocerse la causa y no correspondía a los cambios encontrados en glucosa y lactato. Algunas de las causas que pudieron ocasionar estas variaciones puede ser el hecho de que el reactivo con el que se midió el CO₂ permanece a temperatura ambiente toda la jornada laboral dentro del espectrofotómetro, sin contar con alguna unidad de refrigeración puesto que es usado también por el área de diagnóstico del laboratorio, y que esto afectaba su reactividad con el paso del tiempo. Sin embargo, a pesar de que las concentraciones más bajas de este analito se lograban en las mañanas, a lo largo del día también se presentaban disminuciones en las concentraciones, y no fue posible relacionarlas con la sustitución de reactivo “viejo”. Por estas diferencias en los valores de CO₂ total no se realizó análisis estadístico.

Gráfica 3.

DINÁMICA DE CO₂ TOTAL EN PLASMA DE SANGRE HEPARINIZADA A 4 °C, EN SUERO EN CONTACTO CON COÁGULO ALMACENADO A 4 °C Y A 22 °C

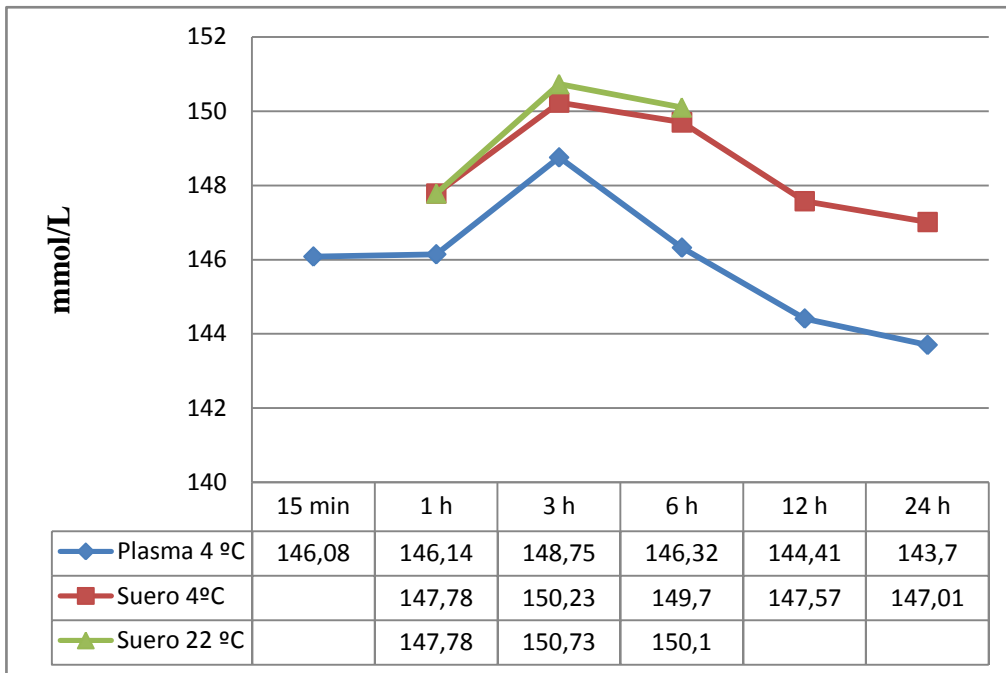


Electrólitos

La dinámica de las concentraciones de sodio, cloro y potasio se presenta en gráficas 4 a 6. Tanto en el sodio como en el cloro no hubo diferencias significativas al comparar los distintos tiempos de análisis; sin embargo, ambos analitos presentaron un incremento de concentraciones aproximado de 2.4 mmol/L (1.7 y 1.8% respectivamente). El potasio presentó un incremento constante en los tres manejos, de 26.3% (1.09%/hora) en plasma heparinizado a 4 °C, 18.3% (0.79%/hora) en suero a 4 °C, y finalmente un 7.8% (1.56%/hora) con suero a 22 °C.

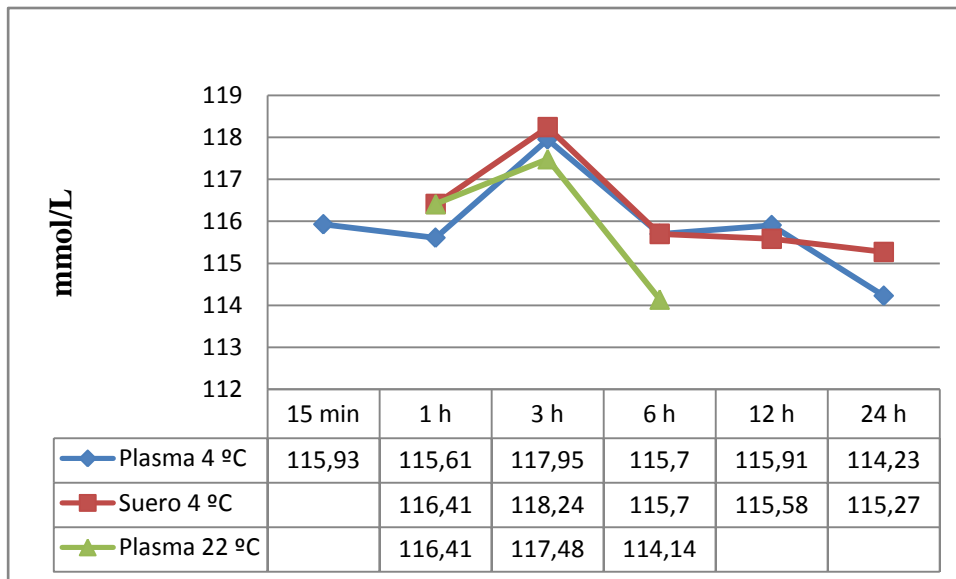
Gráfica 4

DINÁMICA DE LA CONCENTRACIÓN DE SODIO EN PLASMA DE SANGRE HEPARINIZADA ALMACENADA A 4 °C; EN SUERO EN CONTACTO CON COÁGULO A 4 °C Y 22 °C



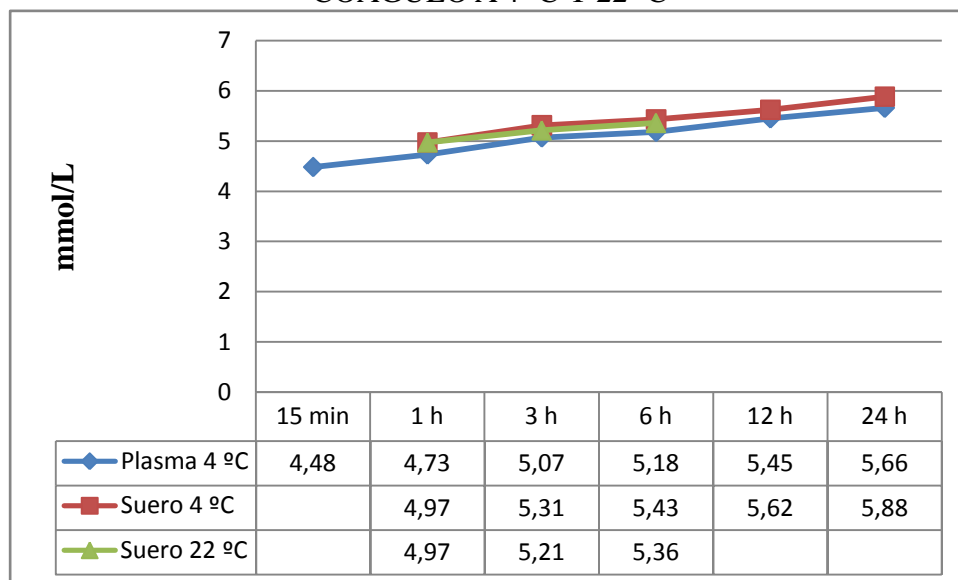
Gráfica 5.

DINÁMICA DE LA CONCENTRACIÓN DE CLORO EN PLASMA DE SANGRE HEPARINIZADA ALMACENADA A 4 °C; EN SUERO EN CONTACTO CON COÁGULO A 4 °C Y 22 °C



Gráfica 6.

DINÁMICA DE LA CONCENTRACIÓN DE POTASIO EN PLASMA DE SANGRE
HEPARINIZADA ALMACENADA A 4 °C; EN SUERO EN CONTACTO CON
COÁGULO A 4 °C Y 22 °C

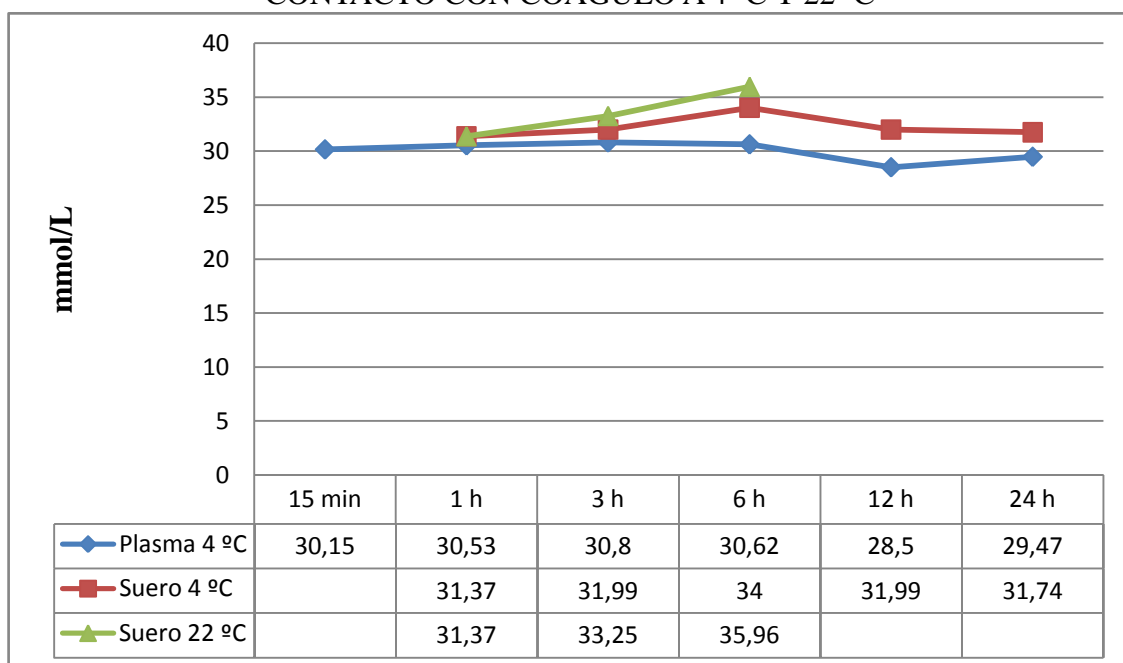


Diferencia de Iones Fuertes

Se calculó la diferencia de iones fuertes restando las concentraciones de sodio y las de cloro. Como se puede ver en la gráfica 7, las diferencias no fueron relevantes.

Gráfica 7.

DINÁMICA DEL CÁLCULO DE DIFERENCIA DE IONES FUERTES EN PLASMA DE SANGRE HEPARINIZADA ALMACENADA A 4 °C; EN SUERO EN CONTACTO CON COÁGULO A 4 °C Y 22 °C



Anion gap

Por variaciones erráticas en valores de bicarbonato, no se calculó en anion gap, el cual normalmente corresponde a la ganancia de ácidos no volátiles.

Discusión

Las concentraciones de glucosa en muestras sanguíneas con leucocitosis a través del tiempo presentaron un decremento correspondiente a datos de literatura.²⁸ La magnitud del descenso en concentraciones de glucosa fue mayor en las muestras de suero en contacto con el coágulo almacenado a 4 °C en comparación al plasma de sangre heparinizada y guardado a la misma temperatura, lo cual en principio demuestra la ventaja de la toma de muestra con heparina sobre la muestra sin uso de anticoagulante.

El suero en contacto con coágulo incubado a 22 °C tuvo un decremento mayor (35.2% en 3 horas) lo cual correlaciona la temperatura de almacén con la estabilidad del analito, la cual fue también probada en estudios realizados en humanos en donde se midió la concentración de glucosa almacenada a 32 °C¹, así como la diferencia en muestras que no presentan leucocitosis, donde el consumo en el mismo tiempo con la misma temperatura fue de 25% en tres horas.¹⁹

De los 10 perros que fueron muestreados, al cabo de 24 horas y de acuerdo a los valores de referencia utilizados en el Laboratorio de Patología Clínica de la FMVZ – UNAM, sólo 3 animales presentaron pseudohipoglucemia en las muestras de suero en contacto con el coágulo a 4 °C, y 2 en muestras de sangre heparinizada. Todas las mediciones en suero en contacto con el coágulo a 22 °C presentaron concentraciones de glucosa por debajo del valor de referencia después de tres horas de la toma de muestra. Los valores de glucosa plasmática de sangre heparinizada presentaron un decremento debajo del valor de referencia debido a la leucocitosis que presentaban los animales; sin embargo, no se encontró alguna referencia que refiera alguna relación entre las muestras heparinizadas y leucocitosis.

El consumo de glucosa *in vitro* en los tres tratamientos, tanto en suero en contacto con coágulo como en plasma de sangre heparinizada (ambos a 4 °C), podría resultar

significativo para la práctica diaria siempre y cuando no hayan pasado más de 6 h y 12 h respectivamente, entre la toma de la muestra y su análisis para determinación de glucosa. En los tres tratamientos se presentó incremento de lactato, siendo significativo con las muestras a 22 °C y observándose en plasma con heparina a 4 °C hasta un 94.7% más en 24 horas (28% en 12 h) y un 74% en suero a 4 °C (69% en primeras 12 h) pasado el mismo lapso de tiempo. En estudios utilizando fluoruro de sodio (NaF-Ox) adicionado a las muestras no se observaron cambios significativos antes de 4 horas a 20 °C,²⁹ mientras que a 22 °C se encontraron incrementos de hasta 30.8% en sólo tres horas, lo cual nos habla de la efectividad del NaF-Ox para prevenir el aumento *in vitro* de lactato en las muestras.

En la clínica de pequeñas especies el lactato no es un analito frecuentemente utilizado, en equinos este analito es común para evaluar rendimiento en el ejercicio y se ha visto que almacenando las muestras a 0 °C no se presentan cambios significativos sin importar el tiempo que pase antes de ser analizadas.⁶ En estudios realizados con anterioridad se observó un incremento de 54.3% después de 1 h que no corresponde con lo encontrado en las observaciones de este estudio.⁶

Los valores de referencia para lactato en suero son de 1.2 – 3.1 mmol/L en animales sanos.¹³ En las mediciones de plasma heparinizado y de suero, ambos a 4 °C, todas sobrepasaron el máximo de referencia pasadas 24 h de la toma de muestra, mientras que en suero sangre a 22 °C el incremento sobrepasando valores de referencia se dio en todas las observaciones y en tan sólo 3 h.

En las muestras donde se va a llevar a cabo la determinación de lactato es conveniente mantener en refrigeración la muestra hasta el momento de su análisis, y que éste no sobrepase las 12 horas, ya sea que se tome la muestra sin anticoagulante o con heparina para la obtención de plasma.

La determinación de CO₂ total es una práctica común en la clínica de pequeñas especies; sin embargo, en este trabajo no se obtuvieron resultados compatibles con otros trabajos,³⁰ porque el reactivo para medir el analito disminuye su estabilidad si se mantiene a temperatura ambiente durante toda la jornada de trabajo y porque las probables pérdidas de CO₂ pueden ser enmascaradas por la deshidratación y consiguiente concentración de la muestra. Las disminuciones que pudieron observarse y que no fueron significativas pudieron deberse al reemplazo de reactivo en caso de haberse acabado, aunque no puede atribuírsele con toda seguridad a este manejo porque no se llevó control sobre él.

Esta variabilidad sobre las concentraciones de CO₂ Total tuvo un impacto en el cálculo de los ácidos no volátiles (anion gap), en el cual se observó un leve incremento en muestras de suero, mientras que por el contrario una disminución al utilizar plasma con heparina. No se encontraron datos de literatura que pudieran relacionar la toma de muestra sin anticoagulante o con heparina que pudieran respaldar este dato, por lo que se tiene que tomar con cautela el establecer cualquier relación en la ganancia de ácidos y la adición de anticoagulante.

En las concentraciones de electrolitos, es evidente que el sodio y el cloro mostraron un aumento en sus concentraciones hasta las 3 h, y posteriormente ambos disminuyeron a lo largo de las 24 h restantes. Los incrementos pueden darse si el manejo de la muestra no es el adecuado y éstas presentan deshidratación; sin embargo, para las disminuciones valdría la pena revisar los coeficientes de variación dentro de los controles de calidad utilizados en el analizador de electrolitos con el fin de validar su precisión. Se han hecho otros estudios estudiando la dinámica de los electrolitos en plasma de sangre heparinizada y se observó un incremento sostenido en el potasio, así como una conducta azarosa en la concentración de sodio.²⁷

Conclusion

El manejo de la muestra desde el momento de la toma hasta su análisis, es indispensable para conservar las concentraciones de glucosa y lactato, especialmente en animales con leucocitosis. Las concentraciones de estos analitos sin separar las células del suero/plasma son afectadas por el tiempo en que la muestra permanece almacenada, y es importante tomarla en cuenta al momento de realizar una interpretación, así como también un incremento en el número de leucocitos acelera estos procesos en los que la glucosa disminuye y el lactato aumenta su concentración.

En CO₂ total (bicarbonato) es necesario establecer la causa de las variaciones erráticas en su medición y complementarlo con valores de analizador de equilibrio ácido-base.

Se recomienda determinar las concentraciones de glucosa y lactato en plasma de sangre heparinizada dentro de 12 h; en suero mantenido en contacto con el coágulo dentro de 6 h posteriores a la obtención de la muestra y almacenado a 4 °C. No es recomendable la toma de muestra sin anticoagulante y su almacenamiento a temperatura ambiente (22 °C), pues los cambios se hace evidentes en muy corto tiempo.

Literatura citada

1. King CM, Rose RJ, Evans DL. The influence of anticoagulant, storage temperature and time on equine plasma lactate concentration. *Aust Vet J* 1994; 71: 382-384.
2. Christopher MM, O'Neil S. Effect of specimen collection and storage on blood glucose and lactate in healthy, hyperthyroid and diabetic cats. *Vet Clin Pathol* 2000; 29: 22-28.
3. Canivet B, Squara P, Elbaze P, Gratecos N, Cassuto JP, Dujardin P, Freychet P. In vitro glucose consumption in severe hyperleukocytosis. A cause of factitious hypoglycemia. *Sem Hop* 1983; 59: 533-536.
4. Murray RK. *Bioquímica de Harper*. Ed. Manual Moderno SA de CV. 24^a edición. México, 1998.
5. Nakamura H, Himamura T, Kimura N, Niho Y, Okeda T, Yanase T. Hypoglycemia, hypopotassemia and hyperleukocytosis associated with squamous cell carcinoma of the lung. *Jpn J Med* 1982; 1: 22-28.
6. Ferrante PL, Kronfeld DS. Effect of sample handling on measurement of plasma glucose and blood lactate concentrations in horses before and after exercise. *Am J Vet Res* 1994; 55: 1497-1500.
7. Fong Yen Hsu. Factors affecting blood glucose. *J Physiol* 1935; 84: 173-186.
8. Luca F, Dodkin S, Annarita A, Murray J, Papisoulitis K. Evaluation of a portable lactate analyzer. *Vet Clin Pat* 2007; 36: 1-6.
9. Chan AY, Swaminathan R, Cockram CS. Effectiveness of sodium fluoride as a preservative of glucose in blood. *Clin Chem* 1989; 35: 315-317.
10. Nakashima K, Takei H, Nasu Y, Andoh Y. D-mannose as a preservative of glucose in blood samples. *Clin Chem* 1987; 33: 708-710.

11. Chan AYW, Ho CS, Chan TYK, Swaminathan R. Effectiveness of sodium fluoride as a preservative of glucose in blood. *Clin Chem* 1989; 35: 315-317.
12. Nelson RW, Couto CG, Bunch SE, Grauer GF, Hawkins EC, Johnson CA, Lappin MR, Taylor SM, Ware WA, Willard MD. *Medicina Interna de pequeños animales*. 2ª edición. Intermédica. Buenos Aires. 1998.
13. Stevenson CK, Kidney BA, Duke T, Snead ECR, Mainar-Jaime C, Jackson ML. Serial blood lactate concentrations in systemically ill dogs. *Vet Clin Path* 2007; 36; 3: 234-239.
14. Ferasin L, Dodkin SJ, Amodio A, Murray JK, Papasouliotis K. Evaluation of a portable lactate analyzer (lactate scout) in dogs. *Vet Clin Path* 2007; 36: 36-39.
15. Jacobson LS, Lobetti RG. Glucose, lactate and pyruvate concentrations in dogs with babesiosis. *Am J Vet Res* 2005; 66: 244-250.
16. Bouda J, Jagos P. Disorders in the acid-base balance. In: Vrzgula, L. *Metabolic disorders and their prevention in animals*. Elsevier. Amsterdam, 248-268. 1991.
17. Stockham SL, Scott MA. *Fundamentals of veterinary clinical pathology*. 1th ed. Iowa State Press, Ames, 2002.
18. Núñez OL, Bouda J. *Patología clínica veterinaria*. 1a edición. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia, UNAM. México, 2007.
19. Zhang DJ, Elswick RK, Miller WG, Bailey JL. Effects of serum-clot contact time on clinical chemistry results. *Clin Chem* 1998; 44: 1325-1333.
20. Cunningham JG. *Textbook of veterinary physiology*, 2nd ed. WB Saunders Company, Philadelphia, 1997.
21. [Traş B](#), [Maden M](#), [Baş AL](#), [Elmas M](#), [Yazar E](#), [Civelek T](#). Investigation of biochemical and haematological side-effects of enrofloxacin in dogs. [J Vet Med A](#) 2001; 48:59-63.

22. Frey LP, Kline KH, Foreman JH. Effects of prerace exercise, furosemide, sex and ambient temperature on blood sodium, bicarbonate and pH values in Standardbred horses. *Equine Vet J* 1995, 27: 170-173.
23. Meyer D. J., Harvey J. W. *Veterinary laboratory medicine, interpretation and diagnosis*. 3rd ed, WB Saunders, Philadelphia, 2004.
24. Thrall MA. *Veterinary hematology and clinical chemistry*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2004.
25. Beach E, Turner J. An enzymatic method for glucose determination in body fluids. *Clin Chem* 1958; 4: 462-475.
26. Bonora R, Panteghini M. An enzymatic method for lactate in whole blood adapted to the Cobas Bio. *Clin Chem*, 1989, 35: 2.
27. Thoresen SI, Havre G, Morberg H, Mowinckel P. Effects of storage time on chemistry results from canine whole blood, heparinized whole blood, serum and heparinized plasma. *Vet Clin Path* 1992; 21: 88-94.
28. Ono T, Kitaguchi K, Takehara M, Shiiba M, Hayami K. Serum constituents analyses: effect of duration and temperature of storage of clotted blood. *Clin Chem* 1981; 27: 35-38.
29. James KM, Polzin DJ, Osborne CA, Olson JK. Effects of sample handling on total carbon dioxide concentrations in canine and feline serum and blood. *Am J Vet Res* 1997; 58: 343 – 347.
30. Foucher B, Pina G, Desjeux G, Prevosto JM, Chaulet JF, Cheminel V. Influence of temperature and delayed centrifugation: stability studies of 28 analytes currently analysed. *Ann Biol Clin (Paris)* 2005; 63: 93 – 100.