



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DINÁMICA DEL EQUILIBRIO ÁCIDO-BASE Y GLUCOSA *IN VITRO* EN PLASMA Y SUERO
DE SANGRE VENOSA DE PERROS SANOS RELACIONADA
CON EL TIEMPO DE ANÁLISIS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
NATALIA PALESTINO PAMPLONA

Asesores:
Dr. Luis Núñez Ochoa
Dr. Jan Bouda



México D.F.

2009



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.

DEDICATORIA

A mi madre por darme todo; por ser el mejor ejemplo de amor, bondad y generosidad. Por ser mi mejor amiga. Este logro también es tuyo.

A mi hermano por inspirarme a ser una mejor persona en todos los aspectos. Porque siempre has estado ahí para mí.

A mis abuelos Grandpa y Tita y toda la familia Pamplona. Ustedes son la mejor familia que alguien puede tener.

A mi padre por apoyarme siempre a pesar de la distancia.

A Fer, porque nunca me dejas olvidar lo lejos que puedo llegar.

A mis hermanas las fus, porque con ustedes aprendí el valor de la amistad verdadera y me convertí en la persona que soy hoy.

A Kíkucho porque me enseñaste la importancia de ser una persona auténtica.

A Mimo, Lau, Chucho y Regis por compartir tanto conmigo y hacer de la universidad la mejor etapa de mi vida.

A Jordi por ser mi compañero incondicional durante esta etapa de mi carrera, por enseñarme que en esta vida bailando y riendo se vive mejor.

A mi facultad y a mi universidad.

A todos los animales cuya existencia el ser humano ha puesto en sufrimiento y en peligro. Con la esperanza de que un día lograremos construir un mundo mejor para ellos.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Núñez por enseñarme tanto, por invertir tiempo, esfuerzo y paciencia en mi trabajo, por su calidad tanto humana como académica.

Al Dr. Bouda por confiar en mí para realizar éste proyecto, por su apoyo incondicional y por sus grandes consejos.

A la QBP Arlette Castillo por su ayuda y por abrírmelas puertas de su laboratorio.

A todos en el Departamento de Patología Clínica por todo lo aprendido y por la disposición de ayudarme en todo momento.

A Mau porque sin tí no hubiera sido posible este trabajo.

A Rodrigo por ayudarme a muestrear perros y por tu compañía.

A Toño por trabajar conmigo hasta tarde.

Al Dr. Tista, a Marina y a todos en Área de Enseñanza Quirúrgica por el apoyo brindado.

A todos los perros que colaboraron en este trabajo con su paciencia y nobleza. Son ellos los que me impulsarán siempre a ser una mejor profesionalista.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MATERIAL Y MÉTODOS.....	10
RESULTADOS.....	13
DISCUSIÓN.....	18
CONCLUSIONES.....	24
REFERENCIAS.....	26
FIGURAS.....	31
CUADROS.....	33

RESUMEN

PALESTINO PAMPLONA NATALIA. Dinámica del equilibrio ácido-base y glucosa *in vitro* en plasma y suero de sangre venosa de perros sanos relacionada con el tiempo de análisis (bajo la dirección de: Dr. Luis Núñez Ochoa y Dr. Jan Bouda)

La información de la que disponemos sobre consumo *in vitro* en muestras sanguíneas de perros es escasa. El objetivo fue determinar los cambios de valores del equilibrio ácido-base, glucosa y lactato en plasma y suero de sangre venosa de perros sanos relacionados con el tiempo de análisis. Se colectaron muestras de 10 perros adultos clínicamente sanos cuyos resultados de hematocrito y leucocitos se encontraron dentro de los límites de referencia. Se realizaron determinaciones en: 1) suero en contacto con el coágulo almacenado a 4 °C (S4); 2) plasma de sangre heparinizada almacenada en agua con hielo (PSH); y 3) suero en contacto con el coágulo almacenado a 22 °C (S22). Se determinaron glucosa, lactato, dióxido de carbono total (CO₂T), sodio, cloro y potasio a los 15 min (sólo en PSH), 1 h, 3 h, 6 h, 12 h y 24 h. No se realizaron determinaciones en S22 a las 12 h y 24 h. En S4 la glucosa y el lactato mostraron diferencias estadísticamente significativas a partir de la primera hora. En PSH la glucosa mostró diferencias estadísticamente significativas a partir de 6 h, y el lactato lo hizo a partir de la primera hora. En S22 la glucosa y el lactato presentaron diferencias tanto estadística como clínicamente significativas en todo momento. El mejor método para evitar el consumo de la glucosa y el aumento de lactato es analizar PSH. Se observó una sobreestimación analítica del bicarbonato y una conducta azarosa de los ácidos no volátiles.

INTRODUCCIÓN

En la práctica clínica de pequeñas especies, las muestras sanguíneas remitidas al laboratorio con frecuencia tardan varias horas en ser procesadas. La interpretación correcta de los análisis bioquímicos depende de varios factores críticos, uno de los cuales es la estabilidad de los analitos.¹ Esta última depende en gran medida del método de almacenamiento y del manejo entre el momento de la toma de muestra y el momento de su evaluación en el laboratorio.² Si bien es de conocimiento general que almacenamiento por tiempo prolongado o exposición a temperaturas elevadas son indeseables en una muestra, existe una carencia de información clara y precisa acerca de la estabilidad de los analitos en medicina veterinaria.¹

En una evaluación preliminar, en el Laboratorio de Bioquímica del Departamento Patología Clínica de la FMVZ de la Universidad Nacional Autónoma de México, se tomaron en cuenta 129 muestras perros recibidas durante el mes de febrero. En el 13.1 % se encontró hipoglucemia sin relación con la anamnesis o el resto de los hallazgos bioquímicos, del mismo modo se encontró disminución del bicarbonato en 11.6 % y de ambos analitos en el 7 %. Los estudios sobre los cambios en los valores bioquímicos de acuerdo al tiempo de separación del plasma/suero, de la temperatura y/o del tipo de muestra en humanos son numerosos.³⁻¹³ De dichos estudios, en pocos se compararon los cambios después de diferentes manejos de la muestra o en periodos menores a 24 h, debido en parte a que en humanos las muestras se toman generalmente en el laboratorio. En medicina veterinaria, se han estudiado estos fenómenos, mayoritariamente involucrando enzimas o sólo valores de equilibrio ácido-base, en caballos¹⁴⁻¹⁷, en rumiantes¹⁸⁻²⁴ y en gatos^{17,25,26}. De dichos estudios, en ninguno se estudiaron cambios *in vitro* en valores de equilibrio ácido-base junto con glucosa y lactato tanto en suero como en plasma. Pocos son los estudios que han registrado las variaciones *in vitro* de los analitos ya mencionados con relación al tiempo en perros.^{1,25,27-30} No se encontró información acerca de estas variaciones generada bajo las condiciones climáticas y geográficas de México. Del mismo modo no se encontró información que simule las condiciones de tiempo y temperatura que

se utilizan en la ciudad de México en la toma y envío de muestras al laboratorio en la clínica de pequeñas especies.

El equilibrio ácido-base es un mecanismo mediante el cual se mantiene una constante relativa de pH a pesar de la producción de productos metabólicos de desecho en el cuerpo y es fundamental para la homeostasis.^{31,32} El pH normal de la sangre es de aproximadamente 7.4, y es necesario que los procesos celulares normales mantengan el pH cercano a éste valor.^{33,34} Esto es debido a que dicho pH permite que los sistemas enzimáticos trabajen de forma óptima y que exista una concentración adecuada de electrólitos en su forma ionizada.³⁵ Bajo ninguna circunstancia es más importante la comprensión y el significado del equilibrio ácido-base que en situaciones de urgencia en la que los animales se enfrentan a problemas físico-químicos que son complejos y peligrosos.^{31,34} En la clínica de pequeñas especies, los trastornos ácido-base son comunes dado que aparecen con frecuencia en condiciones como: diarrea, vómito, insuficiencia renal, deshidratación, neumonía o situaciones que provoquen restricción de la expansión pulmonar, incluidos los procedimientos anestésicos. La alteración de pH resulta de movimientos de agua, electrólitos o de dióxido de carbono (CO_2).³⁵ Es por lo tanto importante contar con métodos confiables y efectivos para evaluar el estado ácido-base de un paciente.

El metabolismo normal genera H^+ que son excretados o amortiguados.³³⁻³⁷ Los amortiguadores “absorben” los H^+ evitando que se acumulen en los líquidos corporales y entre los más importantes se encuentran el bicarbonato y la hemoglobina.³³ El sistema de bicarbonato contribuye con más de 20 mmol/L de la capacidad total de amortiguación, mientras que hemoglobina, fosfatos, amonio, sulfatos y otras proteínas como la albúmina contribuyen con menos de 10 mmol/L.³⁷

Otros mecanismos que intervienen en el equilibrio ácido-base son los compensatorios que ocurren principalmente a nivel pulmonar y renal, mediante la retención o eliminación de CO_2 , el intercambio de iones K^+ y H^+ .³⁴⁻³⁸

El dióxido de carbono total (CO_2T) representa la suma del ión bicarbonato (HCO_3^-) y CO_2 disuelto que incluye su forma no disociada como ácido carbónico (H_2CO_3) y su forma libre (CO_2). El CO_2T es un constituyente de la

sangre estable que, con un manejo adecuado, puede ser medido satisfactoriamente en plasma o suero en las muestras que se emplean de rutina para el análisis bioquímico.^{36,37} La determinación bioquímica de dicho componente proporciona un estimado de la concentración de HCO_3^- en suero, ya que el H_2CO_3 y el CO_2 libre representan sólo el 5 % del CO_2T y se puede utilizar para evaluar trastornos metabólicos del estado ácido-base del animal cuando no es posible realizar determinación de gases sanguíneos.^{25,36}

La determinación de gases sanguíneos comprende la medición de iones hidrógeno (H^+) (pH), la presión parcial de oxígeno (PO_2), la presión parcial de dióxido de carbono (PCO_2) y cálculo de valores de HCO_3^- y exceso de base (EB) en la sangre.³⁷ Éste último representa los mmol/L de ácido ó base fuerte que se deben de añadir a la muestra para producir un pH de 7.40 a una temperatura de 37° C y con una PCO_2 de 40 mm Hg.^{36,37}

Los instrumentos que miden gases sanguíneos poseen membranas selectivas que permiten el paso únicamente de H^+ , O_2 y CO_2 desde la sangre hacia electrodos específicos.³⁷

La relación entre la concentración de H^+ , HCO_3^- y PCO_2 en la sangre normal a 37 °C puede expresarse mediante la ecuación de Henderson-Hasselbalch o mediante su versión no logarítmica.^{33,34,36,37}

$$\text{pH} = 6.1 + \log\left(\frac{[\text{HCO}_3^-]}{(\text{PCO}_2 \times 0.03)}\right) \quad \text{ó} \quad [\text{H}^+] = 24 \times (\text{PCO}_2 / [\text{HCO}_3^-])$$

A partir de esta ecuación las máquinas que miden gases sanguíneos calculan la concentración de HCO_3^- .

La muestra para determinación de gases sanguíneos se debe de guardar en una jeringa cuya aguja sea sellada con un tapón, debe de mantenerse en agua con hielo y debe de ser analizada dentro de 3 h.³⁶ Se prefiere la obtención de sangre arterial que se requiere para asesorar la oxigenación de la sangre aunque la sangre venosa también se puede emplear siempre y cuando se utilicen los rangos de referencia apropiados.^{36,37} Es por lo anterior que muchas veces la determinación de CO_2T y electrólitos en los análisis clínicos de rutina son los únicos parámetros que posee el clínico en cuanto a equilibrio ácido-base.

En cuanto a consumo *in vitro* de bicarbonato en perros, un estudio (James et al., 1997) reporta que hay una disminución estadísticamente significativa de CO_2T después de 4 horas de almacenamiento de sangre completa.²⁵ Schenck

y colaboradores estudiaron el efecto de tiempo y temperatura en valores de calcio ionizado y pH en perros sanos, encontrando un aumento de pH significativo después de 9 horas de almacenamiento tanto a 23 °C como a 4 °C.³⁰

En medicina veterinaria, la especie en la que más se encontraron estudios acerca del consumo *in vitro* del bicarbonato fue en bovinos. Jagos et al.²⁴ encontraron una disminución de bicarbonato estándar estadísticamente significativa después de la quinta hora de almacenamiento de sangre completa heparinizada en agua con hielo. Krokavec et al.²³ publicaron una disminución estadísticamente significativa de bicarbonato estándar después de 6 horas de almacenamiento de la muestra a 37 °C. En los dos últimos estudios mencionados se realizaron las determinaciones mediante gasometría.

Una situación que puede causar disminución artificial del valor de HCO_3^- es el llenado incompleto del tubo en el que se colecta la sangre.^{25,36-39} La PO_2 y PCO_2 de la sangre y el aire rápidamente se equilibran,³⁷ dando como el resultado que el CO_2 contenido en el suero o plasma difunde hacia el aire atrapado en el tubo, que tiene una PCO_2 menor que la sangre.²⁵ Esto sucede independientemente de que el tubo haya sido abierto previo a la toma de muestra. James et al.²⁵ observaron que al tomar muestras sanguíneas en perros el llenado incompleto de tubos con vacío resulta en una falsa disminución de CO_2T hasta de 3.7 ± 1.3 mmol/L.

Los ácido no volátiles (ANV), conocidos como anion gap, se calculan mediante la diferencia de los cationes principales menos los aniones principales ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) – ($\text{Cl}^- + \text{HCO}_3^-$). Su valor sirve para determinar la causa de anomalías en el equilibrio ácido-base. Representan los aniones no incluidos en la ecuación (albúmina, fosfatos, sulfatos y ácidos orgánicos) que intervienen en la ley de la electroneutralidad.³⁴⁻³⁷ Pueden verse incrementados en numerosos padecimientos, como son acidosis láctica, cetoacidosis diabética, insuficiencia renal y ciertas intoxicaciones. Su valor también se puede incrementar erróneamente cuando hay pérdidas *in vitro* de bicarbonato causadas por un mal manejo de la muestra, como lo observaron Osborne et al. en un estudio realizado en perros.³⁶

La teoría de Stewart es un modelo más reciente que propone que todos los electrólitos en los líquidos biológicos se ven involucrados en el equilibrio ácido-

base. Dicho de otro modo, la diferencia entre los cationes fuertes (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) y los aniones fuertes (Cl^- , sulfato, lactato, acetato, beta-hidroxitirato) ejerce una influencia independiente en el pH sanguíneo.^{31,35-37}

Un aumento en la diferencia de iones fuertes se asocia a alcalosis metabólica y una disminución en la misma se asocia a acidosis metabólica.³⁶

Es por lo anterior útil disponer de un perfil de electrólitos junto con los parámetros de equilibrio ácido-base hasta ahora mencionados. Datos incompletos pueden proporcionar información falsa acerca del estado del paciente. El perfil de electrólitos se utiliza básicamente para valorar la severidad de desequilibrios en los líquidos corporales, aunque en ocasiones puede ser de utilidad para apoyar un diagnóstico.³⁶

No se encontraron datos precisos acerca del consumo *in vitro* de electrólitos en animales dentro de las primeras 24 h posteriores a la toma de muestra. En un estudio realizado en humanos⁵ se reportó una diferencia significativa en los valores de potasio en sangre entera a 4° C después de 4 horas de almacenamiento, mientras que en los valores de sodio se encontró una diferencia significativa después de 24 h de almacenamiento a la misma temperatura. Se ha reportado también en humanos⁸ que los valores de potasio no permanecen estables en sangre completa heparinizada a 4 °C ni a 22 °C tras 7 h de almacenamiento. Por otro lado Zhang et al.⁹ determinaron en humanos que el potasio permanece estable en sangre entera a 32 °C durante 3 h, mientras que el cloro permanece estable durante 6 horas.

El metabolismo de la glucosa y la glucemia son anormales en muchas enfermedades; la hiperglucemia e hipoglucemia son hallazgos comunes en el laboratorio, debido a que la glucemia es afectada por numerosos factores.^{36,37}

La concentración de glucosa en sangre es regulada e influenciada por numerosas hormonas, entre las cuales se encuentran: insulina, glucagón, catecolaminas, somatotropina y cortisol.³⁷

Algunas enfermedades que alteran la glucemia en perros son: diabetes mellitus, hiperadrenocorticismos, pancreatitis aguda e hipotiroidismo.^{36,37} La diabetes mellitus es una de las endocrinopatías más comunes en el perro, y puede ser mortal si se diagnostica o se trata en forma incorrecta.⁴⁰ También es

común encontrar hiperglucemia fisiológica posprandial, por excitación o por miedo.^{36,37}

Los eritrocitos de los mamíferos dependen principalmente de la glucosa para satisfacer sus requerimientos energéticos y el 90% de la glucosa utilizada es metabolizada hacia lactato vía la glucólisis. Así, las pérdidas de glucosa y el aumento de lactato en las muestras sanguíneas pueden ser atribuibles en parte a contaminación bacteriana y al metabolismo de las células presentes.^{16,37}

La colección de una muestra sanguínea adecuada requiere de procedimientos especiales para evitar cambios en la glucosa y el lactato después del muestreo.¹⁶

Se debe de separar el suero del plasma de las células sanguíneas si van a transcurrir más de 30 minutos desde la toma de muestra hasta su análisis ya que la glucólisis *in vitro* es responsable de la disminución del 5-10% de la concentración de glucosa por hora a temperatura ambiente.^{36,37} La glucosa sanguínea *in vitro* disminuye en un 84% después de mantener la muestra a 4 °C durante un día y posteriormente a 22 °C durante dos días, cuando las muestras son almacenadas como sangre completa sin anticoagulante y en un 97% cuando son almacenadas como sangre completa heparinizada.¹

La eficacia de fluoruro de sodio (NaF) para preservar la glucosa en muestras sanguíneas ha sido evaluada en diferentes especies, arrojando resultados cuestionables en cuanto a su uso.^{15,16,26,27,41} En un estudio realizado por Ferrasin et al.²⁷ se estudió el efecto del coleccionar la muestra con fluoruro de sodio y oxalato de potasio (NaF-Ox) en seis perros sobre los valores de lactato a través del tiempo. No se encontraron diferencias estadísticas ni clínicamente significativas ni por tiempo (30, 60, 120 y 240 min) ni por temperatura (4 °C y 20 °C), concluyendo que el NaF es eficaz para prevenir el aumento *in vitro* de lactato hasta por 4 horas a 20 °C en perros. Estos resultados concuerdan con estudios de la misma naturaleza realizados en gatos y en caballos.^{15,26}

Sin embargo, la utilización de fluoruro de sodio en la toma de muestras sanguíneas en la clínica de pequeñas especies es una práctica muy poco realizada hoy en día. Probablemente esto se deba a que presenta ciertas desventajas, tales como el encogimiento de los eritrocitos, hemólisis parcial, e interferencia con la determinación de otros analitos.^{16,22,42} En un estudio realizado en caballos, se observó que los valores de glucosa en muestras

colectadas con fluoruro de sodio y oxalato de potasio fueron 6% menores que en las muestras colectadas con heparina. Al mismo tiempo se observó que el volumen de los eritrocitos fue 17% menor en las muestras colectadas con fluoruro de sodio y oxalato de potasio. Estos dos eventos encuentran una explicación en el hecho de que el fluoruro de sodio causa una disminución en tamaño de los eritrocitos y una hemólisis parcial, diluyéndose el contenido de glucosa en el plasma, ya que existe una concentración menor de glucosa en el citoplasma de los eritrocitos que en el plasma.¹⁶

Otro estudio comparó el efecto de diferentes anticoagulantes en los valores de numerosos analitos comúnmente determinados en perros. Se encontró que los valores de suero y los valores en plasma con heparina no arrojaron diferencias significativas, a excepción de un aumento en la albúmina y una disminución en potasio, calcio ionizado y acetilcolinesterasa. Sin embargo, al utilizar NaF encontraron hemólisis evidente en todas las muestras y una disminución significativa comparando con los valores encontrados en suero de la mayoría de los analitos, incluida la glucosa.⁴²

El ácido láctico se produce en exceso durante el metabolismo anaeróbico a medida que la perfusión y oxigenación de los tejidos disminuyen, difunde inmediatamente al líquido extracelular y se disocia en ión hidrógeno y lactato.³⁶ Su determinación se ha vuelto una práctica común en la clínica de pequeñas especies para evaluar el rendimiento en el ejercicio y para valorar la severidad y el pronóstico de muchas condiciones fisiopatológicas.^{27,43-46} Se ha reportado que la concentración de lactato previa a la cirugía en plasma canino es una buena herramienta para predecir necrosis gástrica y la recuperación de perros con dilatación-vólvulo gástrico.⁴³ Asimismo se ha establecido que la concentración de lactato en perros con traumatismos importantes e intoxicaciones y con problemas cardiopulmonares, gastrointestinales y neurológicos es significativamente más elevada que en perros clínicamente sanos o con otros problemas.⁴⁴ Se ha reportado en gatos que la concentración de glucosa aumenta y la de lactato disminuye después de una hora de almacenamiento en suero en contacto con el coágulo a una temperatura de 25 °C.²

Hipótesis

El factor tiempo tiene una influencia negativa sobre la glucemia y la bicarbonatemia disminuyéndolos por consumo *in vitro*, mientras que sobre el lactato es positiva con un incremento artificial tanto en las determinaciones en plasma como en las realizadas en suero.

Objetivo

Determinar los cambios de los valores del equilibrio ácido-base, glucosa y lactato en plasma y suero provenientes de sangre venosa de perros clínicamente sanos relacionados con el tiempo bajo tres formas de manejo de las muestras.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se determinaron las concentraciones de potasio, sodio, cloro, bicarbonato, glucosa y lactato en suero y plasma de perros clínicamente sanos en el Laboratorio de Bioquímica del departamento de Patología Clínica de la FMVZ. El estudio se dividió en 3 partes (A, B y C) de acuerdo al tipo de muestra y el manejo que se le dió a la misma.

Se tomaron muestras de sangre venosa a 10 perros adultos clínicamente sanos con peso de 25 kg o más, mediante contención física manual. No se consideró el género ni la raza como relevantes. Los perros se consideraron clínicamente sanos cuando no se observaron signos de enfermedad y cuando su frecuencia cardiaca y respiratoria, temperatura y palpación transabdominal se encontraron dentro de rangos de referencia. Se realizó el muestreo en un sólo episodio para cada perro, el cual se dividió en diferentes tubos para las 3 partes del estudio. La muestra se obtuvo directamente de la vena yugular. El área a puncionar se rasuró y limpió con una torunda con alcohol. Durante los días de muestreo se registró la temperatura ambiente con un termómetro de exterior.

Fueron descartadas las muestras en las que se encontró hemólisis, eritrocitosis, anemia, leucocitosis o leucopenia. Se tomaron muestras de un nuevo perro para reemplazarlas.

Para la parte A del estudio la sangre se colectó en 5 tubos con vacío (Vacutainer®) sin anticoagulante con capacidad de 3 mL. Todos los tubos se llenaron mediante el sistema de vacío hasta el límite de su capacidad y permanecieron a temperatura ambiente durante la primera hora posterior a la toma de muestra. Transcurrida la primera hora, se centrifugó una muestra y se realizaron las determinaciones. Los cuatro tubos restantes se mantuvieron en refrigeración (4 °C) hasta el momento de su centrifugación y análisis a las 3 h, 6 h, 12 h y 24 h. En esta parte del estudio se utilizó una centrífuga clínica marca Heraeus modelo Labofuge 2000 a 468 gravedades durante 10 min.

Para la parte B del estudio se tomó la muestra en una jeringa heparinizada de 12 mL. Se utilizaron 50 U de heparina sódica por mL de sangre. La primera

centrifugación y determinación se realizó dentro de los primeros 15 min posteriores a la toma de muestra. Después de tomar muestra para la primera determinación, la jeringa se mantuvo en una hielera con agua con hielo y se tomó parte de la muestra para realizar las determinaciones a los siguientes tiempos: 1 h, 3 h, 6 h, 12 h y 24 h. A la hielera se le agregó hielo transcurridas las primeras 12 h, de tal manera que la temperatura de la muestra no sobrepasara los 2 °C. Para cada determinación se transfirieron 1.5 mL de muestra a un tubo Eppendorf mismo que se centrifugó a 12052 gravedades durante 10 min en una microcentrífuga marca Eppendorf.

Para la parte C del estudio se colectó sangre en 2 tubos con vacío (Vacutainer®) sin anticoagulante con capacidad de 3 mL. Ambos tubos se llenaron hasta el límite de su capacidad mediante el sistema de vacío y permanecieron a temperatura ambiente en todo momento hasta el momento de su centrifugación a análisis a las 3 h y 6 h posteriores a la toma de muestra. Las muestras se colocaron en baño maría a 22 °C hasta el momento de su análisis. Para esta parte del estudio se utilizó el mismo equipo y procedimiento de centrifugación que en la parte A.

Adicionalmente se tomó una muestra de aproximadamente 1 mL en un tubo con vacío (Vacutainer®) con EDTA para realizar la lectura del hematocrito, el conteo de leucocitos y la determinación de sólidos totales según los procedimientos manuales estandarizados.⁴⁷

Para todas las determinaciones mencionadas se utilizó un analizador de electrolitos ión selectivo en el caso de sodio, cloro y potasio y un espectrofotómetro marca Selectra Junior (Holanda) en el caso de bicarbonato, lactato y glucosa.

El analizador de electrolitos marca Easy Lite consta de 3 electrodos que reaccionan cada uno con sodio, cloro o potasio, provocando un impulso eléctrico proporcional a la concentración de dichos iones.

Para la determinación de bicarbonato, el espectrofotómetro trabaja mediante un procedimiento enzimático, empleando carboxilasa de fosfoenolpiruvato (PEPC) (Diagnostic Chemicals Limited, Canadá). La disminución en la absorbancia es proporcional a la concentración CO₂T en la muestra.

Para la determinación de glucosa, el espectrofotómetro emplea una modificación del

método de glucosa/peroxidasa (Randox Laboratories Limited, RU).

Para la determinación de lactato, se emplea el método de lactato oxidasa (Randox Laboratories Limited, RU).

Como control de calidad, diariamente tanto en el equipo de electrólitos como en el espectrofotómetro se realizaron determinaciones de un suero control comercial que posee una concentración conocida de sodio, cloro, potasio, bicarbonato, glucosa y lactato.

Análisis de resultados

El análisis de resultados se efectuó mediante estadística descriptiva y prueba de *t* de student para comparar los diferentes tiempos de muestreo y se consideró significativo cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS

Glucosa

Parte A

En las determinaciones realizadas en suero sin separar del coágulo y almacenado a 4 °C (S4), los valores de glucosa promedio determinados a las 3 h, 6 h, 12 h y 24 h fueron menores que el valor de glucosa promedio inicial (1 h). La concentración de glucosa promedio disminuyó en todos los casos con respecto a la determinación anterior (cuadro 1). Se observó una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en todas las determinaciones en comparación con la determinación inicial de 1 h (cuadro 2). La disminución de glucosa con respecto a la medición inicial de 15 min (Δ) fue cada vez mayor en las evaluaciones subsecuentes (cuadro 2). Este fenómeno se hace evidente al expresar la disminución en la concentración de glucosa promedio con respecto a la medición inicial como porcentaje, la pérdida de glucosa se incrementó progresivamente en todas las determinaciones (fig. 1).

Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre las determinaciones realizadas a las 3 h y las realizadas a las 12 h y 24 h ($p=0.019$ y $p=5^{-5}$, respectivamente). Lo mismo ocurrió entre las determinaciones realizadas entre las 6 h y las 12 h y 24 h ($p=0.042$ y $p=4^{-6}$, respectivamente). Las determinaciones realizadas a las 6 h a partir de la toma de muestra no presentan diferencia significativa en comparación con las determinaciones realizadas a las 3 h ($p=0.065$).

Parte B

En las determinaciones realizadas en el plasma de sangre heparinizada y almacenada en agua con hielo (PSH), todas las determinaciones de la concentración de glucosa resultaron ser inferiores a los 15 min iniciales. La concentración promedio de glucosa fue en todos los casos inferior con respecto a la determinación anterior (cuadro 1). La disminución de glucosa con respecto a la medición inicial de 15 min (Δ) aumentó a medida que el periodo en cuestión fue mayor (cuadro 2).

La diferencia entre las determinaciones realizadas en PSH a los 15 min con las de las 6 h, 12 h y 24 h fueron estadísticamente significativas. Si bien hubo una

concentración menor de glucosa a la hora y las 3 horas comparando con la medición inicial, estas diferencias no fueron significativas (cuadro 2).

También se encontraron diferencias significativas entre la primera hora con las 12 h y 24 h (cuadro 2).

Parte C

En las determinaciones realizadas en suero sin separar del coágulo y almacenado a temperatura ambiente controlada (22 °C) (S22), se observó una disminución marcada de la concentración de glucosa a las 3 h y 6 h con respecto a la medición inicial (1 h) (cuadro 1). Cuando se comparó con la determinación en plasma de los 15 min por ser la considerada la de referencia se encontraron diferencias significativas en todas las determinaciones subsecuentes. Sin separar el suero del coágulo, la disminución de la concentración de glucosa fue rápida con relación al tiempo (fig. 1). Entre 1 h y 6 h se observó más del doble de la disminución entre 1 h y 3 h.

En ambas determinaciones (3 h y 6 h), la diferencia con respecto a la determinación inicial de 15 min realizada en plasma fue estadísticamente significativa (cuadro 2). Al cabo de 6 h, la concentración de glucosa disminuyó en un 48.1 % con respecto a la determinación inicial realizada en plasma de sangre heparinizada, y en un 44 % con respecto a la realizada en suero a 1 h del muestreo (fig. 1).

Lactato

Parte A

En las determinaciones en S4, se encontró un incremento constante de lactato durante todo el estudio (cuadro 3). La diferencia en la concentración de lactato promedio con respecto a la medición inicial de 1 h fue aumentando con cada determinación (cuadro 4).

La diferencia de lactato promedio observada a través del tiempo con respecto a la determinación inicial en todos los casos fue estadísticamente significativa (cuadro 4). Entre las determinaciones realizadas a las 3 h, 6 h y 12 h hubo diferencia estadísticamente significativa.

Parte B

En las determinaciones realizadas en PSH, en todas las determinaciones realizadas se observó un aumento del lactato promedio con respecto a la medición inicial realizada a los 15 min de la toma de muestra (cuadro 3). El incremento de lactato se duplicó prácticamente en cada una de las determinaciones subsecuentes (fig. 2).

Al comparar los resultados de lactato obtenidos a través del tiempo con respecto a la determinación inicial, en todos los casos la diferencia resultó ser estadísticamente significativa (cuadro 4). Al tomar como referencia las determinaciones realizadas en la primera hora, la diferencia con las determinaciones subsecuentes también fue estadísticamente significativa en todos los casos. Lo mismo sucedió al comparar el resultado a las 3 h con los resultados subsecuentes.

En cuanto al aumento de lactato promedio expresado en porcentaje, se observó que entre los primeros 15 min y la primera hora y al final del estudio tuvo un incremento inferior a los otros métodos de manejo de las muestras sanguíneas (fig. 2).

Parte C

En las determinaciones de lactato realizadas en S22, se incrementó en todas las determinaciones al comparar con la determinación anterior (cuadro 3 y fig. 2). Se tomó como determinación inicial el lactato en plasma a los 15 min.

El lactato promedio a los 15 min, resultó ser estadísticamente significativo cuando se comparó en los diferentes muestreos subsecuentes (cuadro 4). Del mismo modo, el aumento de lactato a las 3 h y 6 h fue estadísticamente significativo al compararlo contra el lactato obtenido en suero a 1 h del muestreo.

Al finalizar la primera hora, se observó un aumento de lactato 5 veces superior con respecto al aumento de lactato en PSH en similar tiempo (fig. 2). Al cabo de 6 h se incrementó el lactato más del 200% con respecto a la concentración promedio en plasma dentro de los primeros 15 min después del muestreo (fig. 2).

Bicarbonato

Parte A

En las determinaciones realizadas en S4, entre la primera y la tercera hora se observó una disminución (0.06 mmol/L) de la concentración promedio de bicarbonato. Posteriormente, entre la tercera y la sexta hora hubo un aumento de 1.12 mmol/L. Al comparar la sexta y la doceava hora se observó un aumento similar, sin embargo en la determinación final de 24 h hubo una disminución de 2.47 mmol/L al comparar con los resultados obtenidos en la doceava hora (cuadro 5).

En las determinaciones realizadas a las 3 h y en las realizadas a las 24 h se obtuvo una concentración de bicarbonato promedio menor a las determinaciones realizadas inicialmente (1 h). La diferencia observada en dichos casos fue de 0.11 mmol/L entre la tercera y la primera hora y de 0.18 mmol/L entre las 24 h y la primera hora.

Únicamente la diferencia en la concentración de bicarbonato promedio observada entre la primera hora y las 12 h fue estadísticamente significativa (cuadro 6).

Parte B

En las determinaciones realizadas en PSH se observó un aumento sostenido en la concentración de bicarbonato promedio obtenida a lo largo del estudio, tanto al comparar los valores con la determinación anterior, como al compararlos con la determinación inicial a los 15 min. Únicamente se observó una disminución de la concentración de bicarbonato entre las 12 h y las 24 h. El valor de concentración de bicarbonato promedio obtenido a las 24 h fue superior al valor inicial (cuadro 5).

Al comparar los resultados obtenidos a lo largo del estudio con la determinación inicial realizada a los 15 min, solamente a las 6 h y a las 12 h se encontró una diferencia estadísticamente significativa (cuadro 6).

Parte C

En los resultados obtenidos al procesar S22, se obtuvo un valor superior de bicarbonato promedio por 0.96 mmol/L entre los primeros 15 min en PSH y la determinación inicial en suero (1 h). Entre la primera y la tercera hora, el valor

de bicarbonato sufrió una disminución de 0.12 mmol/L, para después aumentar nuevamente entre la tercera y la sexta hora (cuadro 5).

Todas las determinaciones en suero almacenado a 22 °C arrojaron un valor de bicarbonato promedio superior al valor obtenido en PSH a los 15 min.

La diferencia entre la concentración promedio de bicarbonato obtenida a los 15 min y la obtenida a la hora y a la sexta hora fue significativa en ambos casos (cuadro 6). No sucedió así con la diferencia observada entre el valor obtenido a los 15 min y obtenido a las 3 h.

Ácidos no volátiles (ANV)

En las tres partes del estudio, la concentración de los electrólitos sodio, cloro y potasio y el valor de los ANV fueron erráticos (cuadros 7 y 8).

En la parte C del estudio, se observó un aumento sostenido del valor de los ANV. Dicho aumento se observó tanto al comparar con el valor obtenido en la determinación anterior, tanto al comparar con el valor inicial a los 15 min en PSH (cuadro 8).

Los valores de los ANV en suero fueron siempre menores en PSH que en S4.

Tanto en la parte A como en la parte B del estudio ningún valor fue diferente estadísticamente (cuadro 9).

En la parte C del estudio, se encontró una diferencia estadísticamente significativa únicamente entre la primera determinación realizada en suero (1 h) y las 6 h (cuadro 9).

DISCUSIÓN

Los resultados encontrados en este estudio en cuanto a la concentración de glucosa son similares a los encontrados por Thoresen et al.¹ en perros. En dicho estudio la glucosa disminuyó en un 33% en suero sin separar del coágulo y almacenado a 4 °C durante un día. En el presente estudio se encontró una disminución similar de 28% al obtener el mismo tipo de muestra y seguir el mismo manejo durante 24 h. Sin embargo, los resultados varían al comparar valores en plasma de sangre heparinizada. El aumento observado en plasma fue de 44% al cabo de un día manteniendo la muestra a 4 °C y en nuestro estudio fue de sólo 5% a lo largo de todo el estudio, lo cual demuestra la ventaja que representa mantener la muestra en agua con hielo.

En humanos se han encontrado diferencias significativas de la concentración de glucosa después de 24 h a 4 °C y después de 4 h a 23 °C en suero almacenado en contacto con el coágulo,⁵ estos resultados son similares a los obtenidos en esta investigación.

En un estudio similar realizado también en humanos, la glucosa permaneció estable durante 3 h a 32 °C.⁹ La glucosa demostró una estabilidad mucho menor en nuestro análisis, dado que al mantener el suero en contacto con el coágulo a 22 °C a las 3 h la glucosa disminuyó más de un 25%.

En el Laboratorio de Patología Clínica de la FMVZ, los límites de referencia para glucosa son de 3.88 – 6.88 mmol/L. De acuerdo con esto, únicamente en un perro de los diez utilizados para el estudio se observó una pseudohipoglucemia al cabo de 24 h en suero almacenado como sangre completa a 4 °C. En la práctica cotidiana es frecuente observar resultados por debajo de 1 ó 2 mmol/L en cuestión de unas horas. En plasma de sangre heparinizada almacenada en agua con hielo, a pesar de una disminución ligera de la glucosa, en ningún perro se observó hipoglucemia. Esta modalidad de manejo no fue encontrada en la literatura evaluada. Es decir que, aunque estadísticamente significativo en la mayoría de los casos, el consumo *in vitro* observado en la concentración glucosa en las partes A y B del estudio es de importancia clínica cuestionable.

En suero sin separar del coágulo almacenado a temperatura ambiente, en dos perros se observó pseudohipoglucemia al cabo de 3 h y en cinco perros se

observó al cabo de 6 h, lo cual muestra que las diferencias son tanto estadística como clínicamente significativas. La concentración promedio de glucosa se redujo rápidamente hasta llegar a una tercera parte de su valor inicial bajo esta modalidad de manejo de la muestra.

La concentración de glucosa en suero fue menor que la observada en plasma en todo momento, y en suero se registraron pérdidas más grandes en todos los casos dado que se mantuvieron el suero en refrigeración y el plasma en agua con hielo.

La concentración inicial tanto en S4 como en PSH no justifican la colección de una muestra con heparina y almacenamiento de la muestra en agua con hielo si se dispone de los medios para procesar la muestra dentro de la primera hora posterior a la toma de la muestra, salvo en los casos en los que conocer la glucemia del paciente sea de urgencia. Sin embargo, en los casos en los que no sea posible centrifugar la muestra y realizar determinaciones hasta dentro de 6 h a 24 h, de acuerdo a este estudio es preferible coleccionar la muestra con heparina y mantenerla en agua con hielo que coleccionarla sin anticoagulante y mantenerla en refrigeración.

La concentración de lactato se incrementó significativamente a las 3 h manteniendo la muestra a 22 °C, mientras que en un estudio que evaluó la concentración de lactato a través del tiempo en 6 perros coleccionando la muestra con NaF-Ox, no observaron aumento significativo después de 4 h manteniendo la muestra a 20 °C.²⁷ Esta diferencia sugiere que la utilización de dicho anticoagulante es de utilidad para prevenir el aumento artificial de lactato en las muestras.

En caballos se emplea con frecuencia la determinación de este analito para evaluar el rendimiento en el ejercicio y se ha observado que al mantener muestras a 0 °C no hay cambios significativos en la concentración de lactato sin importar el tiempo de almacenamiento de las mismas. La concentración de lactato aumentó en un 54.3% después de 1 h, manteniendo las muestras a 22 °C.¹⁶ Este último aumento es muy similar al observado en el presente estudio de 47.7% de la concentración observada a los 15 min transcurrida 1 h en suero sin separar del coágulo a almacenado a 22 °C.

En un estudio realizado en un caballo se concluyó que mientras la concentración de lactato se mantenga por debajo de 20 mmol/L, el lactato permanece estable hasta por 96 h a 4 °C cuando la muestra se mantiene con heparina de litio.¹⁵ Aun cuando en el presente estudio la sangre heparinizada se mantuvo a menos de 4 °C, al cabo de 24 h se observó un aumento significativo en el lactato. King et al.¹⁵ también encontraron que si se utiliza NaF-Ox como anticoagulante, la concentración de lactato se mantiene estable hasta por 96 h a 31 °C. En este estudio la concentración de lactato no permaneció estable por tanto tiempo, dado que transcurridas 6 h se observó un aumento del 200% a temperatura ambiente debido a la especie y al diferente manejo que incluye el anticoagulante como causa principal.

El lactato presentó un aumento similar en suero en contacto con el coágulo a 4 °C y en plasma de sangre heparinizada almacenada en agua con hielo al comparar los valores con la determinación inicial a lo largo del estudio, excepto en el caso del aumento entre las 12 h y las 24 h en el que el aumento fue superior en plasma que en suero. Probablemente, aún cuando se agregaron hielos a las 12 h a las muestras de sangre heparinizada para evitar un aumento en la temperatura, entre las 12 y 24 h ocurrió un aumento de la temperatura de las muestras y esto aceleró la producción *in vitro* de lactato.

En un estudio realizado en 100 perros se estableció que los valores o límites de referencia para el lactato son de 1.2 – 3.1 mmol/L en animales sanos.⁴⁸ En la parte B del estudio 24 h después de la toma de muestra se observó un valor de lactato promedio mayor (0.1 mmol/L) que el límite superior de referencia, por lo tanto si se mantiene la muestra como sangre heparinizada en agua con hielo, el lactato permanecerá estable por 12 h. No así en las partes A y C, en las que a las 3 h se observó una concentración de lactato promedio por encima del límite superior (0.31 y 1.42 mmol/L respectivamente). De acuerdo dichos límites, en 5 perros se observó hiperlactatemia desde las determinaciones realizadas en 1 h en suero, en 2 perros desde las 3 h, en 2 perros a partir de las 6 h y en uno sólo hasta las 24 h. Las variaciones de lactato observadas en las partes A y C del estudio son de importancia clínica 3 h a partir de la toma de muestra.

Aún cuando se demostró que el mejor método para evitar variaciones *in vitro* de los analitos ya mencionado es mantener la sangre heparinizada en agua

con hielo, los resultados muestran que siguiendo estos lineamientos se debe de tener mayor cautela al interpretar los resultados del lactato que los de glucosa. Las variaciones de glucosa son mucho menos importantes que las del lactato, de acuerdo al análisis estadístico, a los valores iniciales observados a los 15 min y a los intervalos de referencia de cada analito.

El reactivo para la determinación de bicarbonato se incluye en el panel de pruebas por las mañanas y permanece al aire libre a lo largo del día en el espectrofotómetro, salvo en los casos en los que el reactivo se termina y debe de ser reemplazado. Es por ello que las concentraciones más bajas de bicarbonato observadas en las tres partes del estudio fueron las que se realizaron en la mañana (15 min, 1 h, y 24 h) y la más alta observada siempre fue la de las 12 h. El consumo *in vitro* de bicarbonato en las muestras debido al metabolismo de las células presentes y producción de H⁺, se vio enmascarado por la deshidratación del reactivo a lo largo del día. El aumento de la concentración de bicarbonato observado en la mayoría de las determinaciones de este estudio y la variación errática de los resultados en este analito es por lo tanto debido al manejo de dicho reactivo llevado a cabo en el Laboratorio de Patología Clínica de la FMVZ.

Tomando en cuenta lo anterior posiblemente la disminución de bicarbonato entre la primera hora y la tercera hora en suero sin separar del coágulo almacenado a 4 °C sí se pueda atribuir al consumo *in vitro*, en cuyo caso dicha disminución fue de sólo 0.11 mmol/L. Del mismo modo, se podría considerar la disminución de 0.18 mmol/L entre la primera hora y las 24 h observada en la misma parte del estudio, como resultado del consumo *in vitro*. Dicha disminución es similar a la observada por James et al.²⁵ en suero de perros 24 h posteriores a la toma de muestra. Cabe mencionar que dichas disminuciones son pequeñas y en ningún caso estadística ni clínicamente significativas.

Sin embargo, es más probable que las disminuciones de la concentración de bicarbonato observadas en diferentes partes del estudio puedan ser atribuidas al momento de reemplazar el reactivo del bicarbonato conforme se agotaba el mismo, este evento no fue controlado durante los días que se realizó el estudio.

En un estudio realizado por James et al.²⁵ en perros, en el que se estudió principalmente el efecto del llenado incompleto de tubos con vacío pero también el efecto del tiempo sobre la concentración de bicarbonato en tubos completamente llenos, observaron un aumento en la concentración de bicarbonato entre las 4 y 24 h de 0.1 mmol/L. Dicho aumento se atribuyó a los cambios de reactivo de rutina realizados durante el estudio.

Por otro lado, los aumentos observados en la concentración de bicarbonato a lo largo del estudio entre 15 min, 1 h, 3 h, 6 h y 12 h, fueron estadísticamente significativos en varios casos pero carecen de confianza debido a que se sabe que los procesos metabólicos que se llevan a cabo en las muestras consumen el bicarbonato, no lo producen. Cabe mencionar que contrariamente a lo esperado y debido a la sobreestimación de la concentración de bicarbonato en este estudio, en ninguno de los perros se observó hipobicarbonatemia (< 17.0 mmol/L). Lo que sí se observó fue una hiperbicarbonatemia (> 25.0 mmol/L) al menos en una ocasión a lo largo del estudio en 5 perros, 2 de los cuales la presentaron en prácticamente todas las determinaciones realizadas en las tres partes del estudio por la razón ya mencionada.

El valor de los ANV fue variable y no siguió un patrón de aumento o disminución constantes en su valor a lo largo del tiempo. Esto se debe en parte a la sobreestimación del bicarbonato, pero también se puede atribuir a la gran variabilidad que se observó en la determinación de la concentración de los iones.

La concentración de potasio se vio incrementada constantemente a lo largo del estudio, presentando diferencias estadísticamente significativas en comparación con las determinaciones iniciales en las tres partes del estudio. Por su parte, el sodio y el cloro presentaron una conducta azarosa. Valdría la pena revisar los coeficientes de variación dentro de los controles de calidad que se realizan actualmente en el analizador de electrólitos utilizado en el presente estudio, con el fin de validar su precisión.

En diferentes estudios realizados en humanos, se han observado diferencias significativas al almacenar suero como sangre completa en sodio, potasio y cloro en un periodo no mayor de 24 h.^{5,8,9} En un estudio en perros se describen cambios en concentraciones de potasio y sodio a lo largo de 3 días y fueron

significativos en potasio a partir del primer día y en sodio en el tercer día tanto en suero almacenado en contacto con el coágulo como en plasma de sangre completa heparinizada.¹ Cabe mencionar que en dicho estudio el potasio presentó un aumento sostenido y el sodio presentó una conducta azarosa, aunque en ninguno de los dos casos los cambios fueron de la magnitud observada en el presente estudio.

Únicamente en la parte C del estudio y sin tomar en cuenta la primera determinación realizada en plasma a los 15 min, el valor de los ANV presentó un aumento a las 3 h y nuevamente a las 6 h. Esto se debe a la sobreestimación observada en el potasio y el sodio.

El coeficiente de variación observado la concentración de los iones e incluso del bicarbonato a lo largo de las 24 h es alto en la mayoría de los casos, lo cual revela una inconsistencia de los resultados. El coeficiente de variación observado en los resultados de la concentración de sodio y bicarbonato fue mayor de 8% en ambos casos. El coeficiente de variación observado en la media del valor de los ANV a lo largo del estudio fue alto con valores de 22.15% en la parte A, 29.73% en la parte B y 16.9% en la parte C. Es por esta razón que el valor de los ANV obtenido en el estudio no es confiable y sería inútil realizar mayores interpretaciones o discusiones al respecto.

CONCLUSIONES

En este estudio se estableció que el consumo *in vitro* de la glucosa y el aumento artificial de lactato se lleva a cabo en los tres tipos de manejo de muestras sanguíneas.

Se consume la glucosa y aumenta el lactato con mayor rapidez al mantener el suero en contacto con el coágulo a temperatura ambiente (22 °C), seguido por suero en contacto con el coágulo en refrigeración (4 °C) para finalizar con plasma de sangre heparinizada almacenada en agua con hielo. La mejor alternativa para conservar la concentración real de glucosa y evitar el aumento excesivo en la producción de lactato, cuando no es posible la centrifugación y separación del suero o en su caso del plasma inmediatamente, es tomar la muestra con heparina y mantenerla en agua con hielo. Este manejo garantiza resultados confiables hasta por 6 h posteriores a la toma de muestra.

De no ser posible colectar la muestra con heparina, al colectarla sin anticoagulante se debe mantener en refrigeración considerando que existe una variación importante en los valores de glucosa y sobre todo de lactato que deben de ser tomadas en cuenta al momento de la interpretación de los resultados y toma de decisiones en la clínica.

No se recomienda mantener el suero en contacto con el coágulo a temperatura ambiente (22 °C) debido a que conduce a resultados no confiables, ya que al transcurrir 3 h después de la toma de muestra, la glucosa habrá disminuido por un cuarta parte de su valor original y el lactato habrá doblado el mismo.

Lamentablemente el comportamiento errático y la sobreestimación tanto del bicarbonato como de los electrólitos que se observó en este estudio impiden realizar recomendaciones para evitar variaciones *in vitro* de bicarbonato y de valores de ácidos no volátiles. Tanto el bicarbonato como el sodio, el cloro y el potasio son analitos sumamente inestables y altamente susceptibles de sufrir variaciones no sólo por el manejo de la muestra como ya se ha demostrado en anteriores estudios, sino también por el manejo de los equipos y los reactivos que se emplean para el procesamiento de las muestras. Sería importante analizar dichos procesos dentro del Laboratorio de Patología Clínica de la FMVZ, especialmente los que se refieren al manejo del reactivo utilizado para la determinación del bicarbonato, con el fin de evitar un aumento artificial de

dicho analito en los análisis realizados a lo largo del día. Los resultados resaltan la importancia de contar con un manejo óptimo de reactivo y con un control de calidad estricto de los equipos utilizados en laboratorios de patología clínica, para proporcionar un servicio de calidad y una herramienta útil para la toma de decisiones en la clínica de pequeñas especies.

REFERENCIAS

1. 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 Pathol* 1992; 21(3): 88-94.
2. Ihedioha JI, Onwuche RC. Artfactual changes in PCV, hemoglobin concentration, and cell counts in bovine, caprine, and porcine blood stored at room temperature and refrigerator temperatures. *Vet Clin Pathol* 2007; 36(1): 60-63.
3. Heinz M, Heil W, Withold W. Storage of serum or whole blood? Effects of time and temperature on 22 serum analytes. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33(4): 231-238.
4. Donnelly JG, Soldin SJ, Nealon DA, Hicks JM. Stability of 25 analytes in human serum at 22 °C, 4 °C and -20 °C. *Pediatr Pathol Lab Med* 1995; 15(6): 869-874.
5. 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(1): 35-38.
6. Clark S, Youngman LD, Palmer A, Parish S, Peto R, Collins. Stability of plasma analytes after delayed separation of whole blood: implications for epidemiological studies. *Int J Epidemiol* 2003; 32(1): 125-130.
7. Rehak NN, Chiang BT. Storage of whole blood: effect of temperature on the measured concentration of analytes in serum. *Clin Chem* 1988; 34(10): 2111-2114.
8. 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(1): 93-100.
9. Zhang DJ, Elswick RK, Miller WG, Bailey JL. Effects of serum-clot

- contact time on clinical chemistry results. *Clin Chem* 1998; 44(6 Pt 1): 1325-1333.
10. Devgun MS. Delay centrifugation and measurement of serum constituents in normal subjects. *Clin Pysiol Biochem* 1989; 7(3-4): 189-197.
 11. Poge AW, Otto U. Changes in acid-base and blood gas parameters in relation to storage time. *Z Gesamte Inn Med* 1980; 35(9): 375-378.
 12. Pini C, Sommariva D, Branchi A, Scandiani L, Fasoli A. Effects of serum storage on the determination of cholesterol. *Ric Clin Lab* 1990; 20(1): 37-44.
 13. Keller H. Errors, resulting from storage, in the determination of 11 parameters in heparinized whole blood and plasma. *Z Klin Chem Klin Biochem* 1975; 13(6): 217-224.
 14. Lindner A. Comparison of clinical chemical variables in blood plasma and serum of horses. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991; 29(12): 837-840.
 15. King CM, Rose RJ, Evans DL. The influence of anticoagulant, storage temperature and time on equine plasma lactate concentration. *Aust Vet J* 1994; 71(11): 382-384.
 16. 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(11): 1497-1500.
 17. Ogilvie GK, Engelking LR, Anwer S. Effects of plasma sample storage on blood ammonia, bilirubin and urea nitrogen concentrations: cats and horses. *Am J Vet Res* 1985; 46(12): 2619-2622.
 18. Jones DG. Stability and storage characteristics of enzymes in cattle blood. *Res Vet Sci* 1985; 38(3): 301-306.
 19. Jones DG. Stability and storage characteristics of enzymes in sheep blood. *Res Vet Sci* 1985; 38(3): 307-311.
 20. Blincoe C, Marble DW. Storage stability of some bovine plasma

- enzymes. Am J Vet Res 1985; 46(6): 1242-1244.
21. Spate MP, Burks MF, Evans PS, Tumbleson ME. Concentrations and activities of bovine serum biochemic constituents as a function of storage time and temperature. Clin Biochem 1970; 3(2): 137-149.
 22. Poulsen JS, Surynek J. Acid-base status of cattle blood. Sampling and storing. Nord Vet Med 1977; 29(6): 271-283.
 23. Krokavec M, Simo K, Martinko A. Changes in the acid-base equilibrium in cattle in relation to the time intervals between sampling and study under field conditions. Vet Med (Praha) 1987; 32(3): 145-150.
 24. Jagos P, Bouda J, Prikrylova J. The dynamics of the acid-base changes of bovine venous blood *in vitro*, as depending on time. Vet Med (Praha) 1977; 22(5): 257-262.
 25. 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(4): 343-347.
 26. 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(1): 22-28.
 27. Ferasin L, Dodkin SJ, Amodio A, Murray JK, Papasouliotis K. Evaluation of a portable lactate analyser (Lactate Scout) in dogs. Vet Clin Pathol 2007; 36(1): 36-39.
 28. Thoresen SI, Tverdal A, Havre G, Morberg H. Effects of storage time and freezing temperature on clinical chemical parameters from canine serum and heparinized plasma. Vet Clin Pathol 1995; 24(4): 129-133.
 29. Reynolds B, Taillade B, Médaille C, Palenché F, Trumel C, Lefebvre P. Effect of repeated freeze-thaw cycles on routine plasma biochemical constituents in canine plasma. Vet Clin Pathol 2006; 35(3): 339-340.
 30. Schenck PA, Chew DJ, Brooks CL. Effects of storage on serum

- ionized calcium and pH values in clinically normal dogs. *Am J Vet Res* 1995; 56(3): 304-307.
31. Rubash MJ. Metabolic acid-base disorders. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2001; 31(6): 1323-1354.
 32. Bailey JE, Pabo LS. Practical Approach to acid-base disorders. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1998; 28(3): 645-662.
 33. Cunningham JG. Textbook of veterinary physiology. 2a ed. WB Saunders Company. 1997. Philadelphia, EUA.
 34. Núñez OL, Bouda J. Patología clínica veterinaria. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2007. México DF, México.
 35. Núñez OL. Acid-base principles and practical interpretation in small animals. Proceedings 30th World Congress of The World Small Animal Veterinary Association 2005. México DF, México.
 36. Latimer KS, Mahaffey EA, Prasse KW. Duncan & Prasse's veterinary laboratory medicine clinical pathology. 4a ed. Blackwell Publishing 2003. Ames, EUA.
 37. Stockham SL, Scott MA. Fundamentals of veterinary clinical pathology. Iowa State Press 2002. Ames, EUA.
 38. Bush BM. Interpretation of Laboratory Results for Small Animal Practitioners. 1a ed. Blackwell Science 1991. Oxford, RU.
 39. Herr RD, Swanson T. Pseudometabolic acidosis caused by underfill of vacutainer tubes. *Ann Emerg Med*. 1992; 21(2): 177-180.
 40. Birchard SJ, Sherding RG. Manual clínico de pequeñas especies. Mc Graw Hill Interamericana. 1996. México DF.
 41. Chan AY, Ho CS, Cockram CS, Swaminathan R. Handling of blood specimens for glucose analysis. *J Clin Chem Clin Biochem* 1990; 28(3): 185-186.
 42. Cerón JJ, Martínez-Subiela S, Hennemann C, Tecles F. The effects of different anticoagulants on routine canine plasma biochemistry. *Vet J*

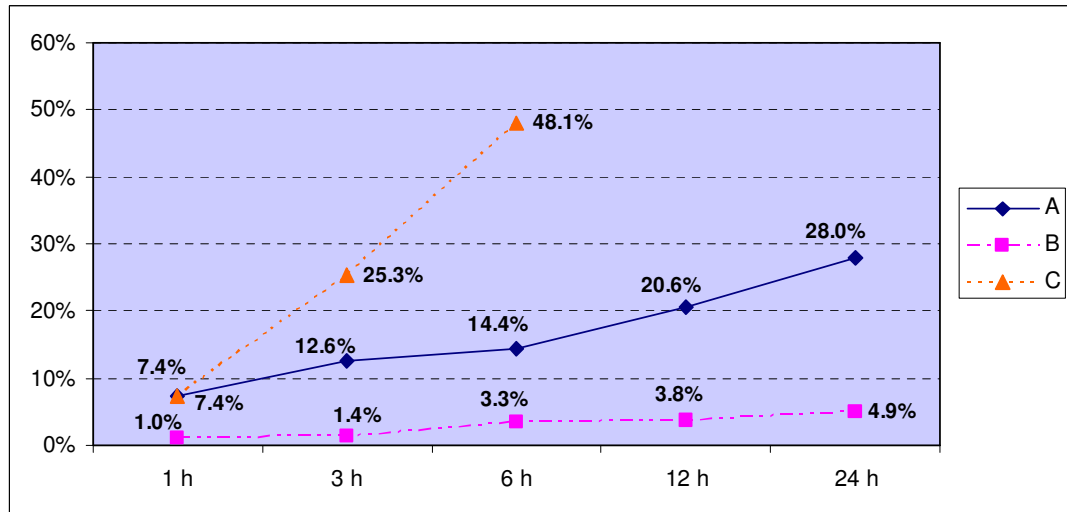
2004; 167: 294-301.

43. De Papp E, Drobatz KJ, Dez Hughes. Plasma lactate concentration as a predictor of gastric necrosis and survival among dogs with gastric dilatation-volvulus: 102 cases (1995-1998). *J Am Vet Med Assoc* 1999; 215(1): 49-52.
44. Lagutchik MS, Ogilvie GK, Hackett TV, Wingfield WE. Increased lactate concentrations in ill and injured dogs. *J Vet Emerg Crit Care*. 1998; 8(2):117-127.
45. Stevenson CK, Kidney BA, Duke T, Snead EC, Mainar-Jaime RC, Jackson ML. Serial blood lactate concentrations in systematically ill dogs. *Vet Clin Pathol* 2007; 36(3): 234-239.
46. Levin GM, Bonczynski JJ, Ludwig LL, Barton LJ, Loar AS. Lactate as a diagnostic test for septic peritoneal effusions in dogs and cats. *J Am Anim Hosp Assoc* 2004; 40: 364-371.
47. Thrall MA. *Veterinary hematology and clinical chemistry*. Lippincott Williams & Wilkins 2004. Philadelphia, EUA.
48. Stevenson CK, Kidney BA, Duke T, Snead EC, Jackson ML. Evaluation of the Accutrend for lactate measurement in dogs. *Vet Clin Pathol* 2007; 36(3): 261-266.

FIGURAS

Figura 1.

Diferencia de la concentración de glucosa en tres formas de manejo y conservación de las muestras sanguíneas, expresadas en porcentaje con respecto a la determinación inicial (n=10).



A. Suero sin separar del coágulo y almacenado a 4 °C (n=10)

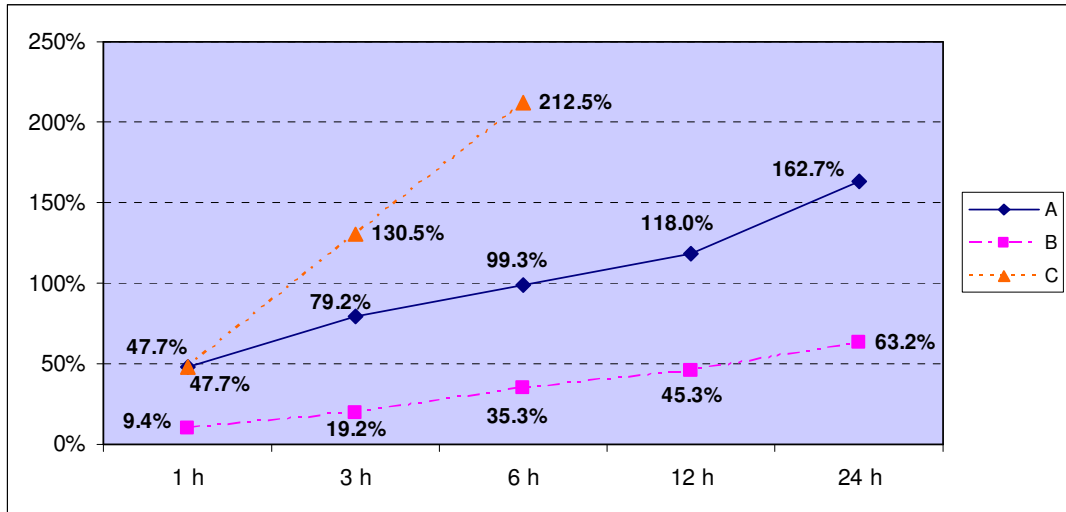
B. Plasma de sangre heparinizada y almacenada en agua con hielo (n=10)

C. Suero sin separar del coágulo y almacenado a 22 °C (n=10)

La determinación inicial empleada para los tres métodos de manejo de la muestra corresponde al valor encontrado a los 15 min en plasma.

Figura 2.

Aumento de lactato observado en tres formas de manejo y conservación de las muestras sanguíneas expresado en porcentaje con respecto a la determinación inicial (n=10).



A. Suero sin separar del coágulo y almacenado a 4 °C (n=10)

B. Plasma de sangre heparinizada y almacenada en agua con hielo (n=10)

C. Suero sin separar del coágulo y almacenado a 22 °C (n=10)

La determinación inicial empleada para los tres métodos de manejo de la muestra corresponde al valor obtenido a los 15 min en plasma.

CUADROS

Cuadro 1. Concentración de glucosa dependiendo del tiempo en tres formas de manejo y conservación de muestras sanguíneas

	15 min	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
A	NA	6.04 ± 0.7	5.7 ± 0.64	5.58 ± 0.56	5.18 ± 0.4	4.69 ± 0.68
B	6.52 ± 0.71	6.46 ± 0.75	6.43 ± 0.71	6.31 ± 0.61	6.28 ± 0.77	6.2 ± 0.83
C	NA	6.46 ± 0.75	4.87 ± 0.83	3.38 ± 0.83	NA	NA

A. Suero sin separar del coágulo y almacenado a 4 °C (n=10)

B. Plasma de sangre heparinizada y almacenada en agua con hielo (n=10)

C. Suero sin separar del coágulo y almacenado a 22 °C (n=10)

NA. No se realizaron pruebas en ese tiempo.

Los valores están expresados como media ± desviación estándar, en mmol/L.

Cuadro 2. Disminución de glucosa con respecto a las mediciones iniciales expresada en valor absoluto y resultados de la prueba *t* de student en tres formas de manejo y conservación de muestras sanguíneas

Tiempos comparados	Parte A		Parte B		Parte C	
	Δ	Valor p	Δ	Valor p	Δ	Valor p
15 min* vs 1 h	0.48	0.002	0.06	0.2041	0.48	0.0020
15 min* vs 3 h	0.82	0.0003	0.09	0.1469	1.65	0.00003
15 min* vs 6 h	0.94	0.0001	0.21	0.0153	3.14	1 ⁻⁶
15 min* vs 12h	1.34	0.0001	0.24	0.0121	NA	NA
15 min* vs 24 h	1.83	1 ⁻⁵	0.32	0.0074	NA	NA
1 h vs 3 h	0.34	0.00215	0.03	0.2902	1.17	0.00005
1 h vs 6 h	0.46	0.00099	0.15	0.0631	2.66	2 ⁻⁵
1 h vs 12 h	0.86	0.00287	0.18	0.0067	NA	NA
1 h vs 24 h	1.35	0.00001	0.26	0.0034	NA	NA

A. Suero sin separar del coágulo y almacenado a 4 °C (n=10)

B. Plasma de sangre heparinizada y almacenada en agua con hielo (n=10)

C. Suero sin separar del coágulo y almacenado a 22 °C (n=10)

NA. No se realizaron pruebas en ése tiempo.

Δ. Disminución de glucosa promedio expresada en mmol/L.

* Los sueros de la parte A y C fueron comparados con el resultado de plasma a los 15 min.

Cuadro 3. Concentración de lactato dependiendo del tiempo en tres formas de manejo y conservación de muestras sanguíneas

	15 min	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
A	NA	2.89 ± 0.74	3.51 ± 0.83	3.91 ± 0.78	4.27 ± 0.81	5.15 ± 0.83
B	1.96 ± 0.54	2.14 ± 0.65	2.34 ± 0.61	2.65 ± 0.79	2.85 ± 0.61	3.2 ± 0.99
C	NA	2.14 ± 0.65	4.52 ± 0.92	6.13 ± 1.1	NA	NA

A. Suero sin separar del coágulo y almacenado a 4 °C (n=10)

B. Plasma de sangre heparinizada y almacenada en agua con hielo (n=10)

C. Suero sin separar del coágulo y almacenado a 22 °C (n=10)

NA. No se realizaron pruebas en ese tiempo.

Los valores están expresados como media ± desviación estándar, en mmol/L.

Cuadro 4. Aumento de lactato con respecto a las mediciones iniciales expresado en valor absoluto y resultados de la prueba t de student en tres formas de manejo y conservación de muestras sanguíneas

Tiempos comparados	Parte A		Parte B		Parte C	
	Δ	Valor p	Δ	Valor p	Δ	Valor p
15 min* vs 1 h	0.93	2 ⁻⁵	0.18	0.0031	0.93	2 ⁻⁵
15 min* vs 3 h	1.55	1 ⁻⁵	0.38	2 ⁻⁵	2.56	1 ⁻⁶
15 min* vs 6 h	1.95	2 ⁻⁶	0.69	3 ⁻⁵	4.17	1 ⁻⁷
15 min* vs 12h	2.31	3 ⁻⁶	0.89	3 ⁻⁵	NA	NA
15 min* vs 24 h	3.19	2 ⁻⁸	1.24	2 ⁻⁵	NA	NA
1 h vs 3 h	0.62	7 ⁻⁵	0.20	0.002	1.63	1 ⁻⁶
1 h vs 6 h	1.02	2 ⁻⁵	0.51	0.0001	3.24	2 ⁻⁷
1 h vs 12 h	1.38	4 ⁻⁶	0.71	0.0002	NA	NA
1 h vs 24 h	2.17	1 ⁻⁷	1.06	0.0000	NA	NA

A. Suero sin separar del coágulo y almacenado a 4 °C (n=10)

B. Plasma de sangre heparinizada y almacenada en agua con hielo (n=10)

C. Suero sin separar del coágulo y almacenado a 22 °C (n=10)

NA. No se realizaron pruebas en ese tiempo.

Δ . aumento de lactato promedio expresado en mmol/L.

* Los sueros de la parte A y C fueron comparados con el resultado de plasma a los 15 min.

Cuadro 5. Concentración de bicarbonato dependiendo del tiempo en tres formas de manejo y conservación de muestras sanguíneas

	15 min	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
A	NA	22.61 ± 3.98	22.55 ± 3.41	23.67 ± 4.22	24.9 ± 5.73	22.43 ± 2.95
B	21.65 ± 4.16	22.06 ± 4.07	22.85 ± 4.3	23.78 ± 4.49	24.72 ± 6.27	21.80 ± 3.27
C	NA	22.86 ± 4.14	22.49 ± 3.21	22.94 ± 4.26	NA	NA

A. Suero sin separar el coágulo y almacenado a 4 °C (n=10)

B. Plasma de sangre heparinizada y almacenado en agua con hielo (n=10)

C. Suero sin separar del coágulo y almacenado a 22 °C (n=10)

NA. No aplica. No se realizaron pruebas a ése tiempo en dicha parte del estudio.

Los valores están expresados como media ± desviación estándar, en mmol/L.

Cuadro 6. Aumento/disminución de bicarbonato con respecto a las mediciones iniciales expresadas en valor neto y resultados de la prueba *t* de student en tres formas de manejo y conservación de muestras sanguíneas

Tiempos comparados	Parte A		Parte B		Parte C	
	Δ	Valor p	Δ	Valor p	Δ	Valor p
15 min* vs 1 h	0.96	0.0244	0.41	0.21455	0.96	0.02436
15 min* vs 3 h	0.90	0.0753	0.93	0.07486	0.84	0.07430
15 min* vs 6 h	2.02	0.0084	2.13	0.00805	1.29	0.02325
15 min* vs 12h	3.27	0.0113	3.07	0.01855	NA	NA
15 min* vs 24 h	0.78	0.2212	0.15	0.42140	NA	NA
1 h vs 3 h	-0.11	0.47025	0.52	0.1960	-0.61	0.4357
1 h vs 6 h	1.06	0.07963	1.72	0.0372	0.33	0.2840
1 h vs 12 h	2.31	0.02393	2.66	0.0471	NA	NA
1 h vs 24 h	-0.18	0.43808	-1.06	0.3753	NA	NA

A. Suero sin separar del coágulo y almacenado a 4 °C (n=10)

B. Plasma de sangre heparinizada y almacenada en agua con hielo (n=10)

C. Suero sin separar del coágulo y almacenado a 22 °C (n=10)

NA. No se realizaron pruebas en ese tiempo.

Δ. aumento o disminución (-) de bicarbonato promedio expresado en mmol/L.

* Los sueros de la parte A y C fueron comparados con el resultado de plasma a los 15 min.

Cuadro 7. Concentraciones de sodio, potasio y cloro dependiendo del tiempo en tres formas de manejo y conservación de muestras sanguíneas

		15 min	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
SODIO	A	NA	146.51 ± 2.16	147.45 ± 2.19	147.12 ± 2.38	145.28 ± 2.16	146.6 ± 4.08
	B	144.75 ± 3.15	143.58 ± 2.8	145.34 ± 3.11	143.37 ± 2.73	144.23 ± 2.33	143.74 ± 4.11
	C	NA	146.51 ± 2.16	148.41 ± 3.3	147.76 ± 3.19	NA	NA
POTASIO	A	NA	4.81 ± 0.45	5.08 ± 0.17	5.19 ± 0.32	5.18 ± 0.4	5.45 ± 0.55
	B	4.27 ± 0.34	4.43 ± 0.32	4.84 ± 0.47	4.84 ± 0.35	4.98 ± 0.45	5.35 ± 0.37
	C	NA	4.81 ± 0.45	4.96 ± 0.38	5.15 ± 0.37	NA	NA
CLORO	A	NA	115.7 ± 4.03	115.8 ± 3.6	114.8 ± 3.73	114.3 ± 4.04	115.7 ± 2.92
	B	115 ± 3.23	114.9 ± 3.38	115.8 ± 3.45	114.3 ± 4.02	114 ± 2.87	114.4 ± 2.08
	C	NA	115.7 ± 4	116.5 ± 5.46	114 ± 3.62	NA	NA

A. Suero sin separar el coágulo y almacenado a 4 °C (n=10)

B. Plasma de sangre heparinizada y almacenado en agua con hielo (n=10)

C. Suero sin separar del coágulo y almacenado a 22 °C (n=10)

NA. No se realizaron pruebas en ese tiempo.

Los valores están expresados como media ± desviación estándar, en mmol/L.

Cuadro 8. Valores de ácidos no volátiles dependiendo del tiempo en tres formas de manejo y conservación de muestras sanguíneas

	15 min	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
A	NA	13.04 ± 3.12	14.1 ± 2.47	13.85 ± 5.07	11.20 ± 3.93	13.90 ± 5.32
B	12.41 ± 1.90	11.04 ± 3.23	11.77 ± 3.83	10.09 ± 6.04	10.47 ± 4.58	12.89 ± 5.52
C	NA	13.04 ± 3.12	14.39 ± 4.15	15.99 ± 4.79	NA	NA

A. Suero sin separar el coágulo y almacenado a 4 °C (n=10)

B. Plasma de sangre heparinizada y almacenado en agua con hielo (n=10)

C. Suero sin separar del coágulo y almacenado a 22 °C (n=10)

NA. No se realizaron pruebas en ese tiempo.

Los valores están expresados como media ± desviación estándar.

Cuadro 9. Comparación de resultados de ácidos no volátiles en tres formas de manejo y conservación de muestras sanguíneas

Tiempos comparados	<u>Parte A</u> Valor p	<u>Parte B</u> Valor p	<u>Parte C</u> Valor p
15 min* vs 1 h	0.2947	0.0771	0.1248
15 min* vs 3 h	0.0089	0.2923	0.4677
15 min* vs 6 h	0.2114	0.1270	0.0955
15 min* vs 12h	0.2346	0.1458	NA
15 min* vs 24 h	0.1620	0.3746	NA
1 h vs 3 h	0.1092	0.2572	0.0553
1 h vs 6 h	0.2259	0.3328	0.0091
1 h vs 12 h	0.0702	0.3962	NA
1 h vs 24 h	0.2734	0.1514	NA

A. Suero sin separar del coágulo y almacenado a 4 °C (n=10)

B. Plasma de sangre heparinizada y almacenada en agua con hielo (n=10)

C. Suero sin separar del coágulo y almacenado a 22 °C (n=10)

NA. No se realizaron pruebas en ese tiempo.

* Los sueros de la parte C fueron comparados con el resultado de plasma a los 15 min.