



PERÚ

Ministerio
de Salud

Viceministerio
de Prestaciones y
Aseguramiento en Salud

Hospital
Víctor Larco Herrera

"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres"
"Año del Bicentenario, de la consolidación de nuestra Independencia, y de la conmemoración de las heroicas batallas de Junín y Ayacucho"

HOSPITAL NACIONAL VÍCTOR LARCO HERRERA

DEPARTAMENTO DE APOYO MEDICO COMPLEMENTARIO

SERVICIO DE APOYO AL DIAGNOSTICO



UNIDAD DE LABORATORIO CLÍNICO

DOCUMENTO TÉCNICO

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DEL AREA DE BIOQUÍMICA DEL HOSPITAL VÍCTOR LARCO HERRERA - 2024



Jefe Servicio de Apoyo al Diagnóstico
MC Carlos Alfonso Miranda Flores
Responsable
T.M. Soledad Ali Albán

2024



ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	3
II.	FINALIDAD.....	3
III.	OBJETIVOS	3
IV.	ÁMBITO DE APLICACIÓN	3
V.	BASE LEGAL	3
VI.	CONTENIDO.....	3
6.1	Definiciones	3
6.2	Tipos de Pruebas Bioquímicas	4
6.3	Descripción del Tipo de Ensayo	4
6.4	Parámetros y Magnitudes e Intervalos de Medición.....	5
6.5	Equipos, Reactivos y Consumibles.....	5
6.6	Procedimiento de Calibración de Equipos	7
6.7	Procedimientos de Control de Calidad	7
6.8	Pruebas.....	9
6.8.1	Dosaje de Ácido Úrico.....	9
6.8.2	Alanina Aminotransferasa	11
6.8.3	Aspartato Aminotransferasa	12
6.8.4	Albumina	14
6.8.5	Bilirrubinas Totales y Fraccionadas (Método de Jendrasick)	15
6.8.6	Colesterol – Método CHOD-PAP-Enzimático.....	17
6.8.7	Colesterol HDL – Colesterol de Alta Densidad.....	19
6.8.8	Colesterol LDL – Colesterol de Baja Densidad	22
6.8.9	Creatinina (Método de Jaffe sin desproteinizar)	24
6.8.10	Depuración de Creatinina	25
6.8.11	Creatina quinasa (CK ó CPK)	29
6.8.12	Glucosa (Método de la Glucosa Oxidasa).....	30
6.8.13	Triglicéridos (Método Enzimático).....	32
6.8.14	Urea (Método Enzimático)	34
6.8.15	Fosfatasa Alcalina (ALP)	35
6.8.16	Gammma glutamil transpeptidasa.....	37
6.8.17	Tolerancia a la Glucosa	38
6.8.18	Proteínas Totales.....	41
6.9	Rutinas.....	42
6.10	Lineamientos	42
VII.	RESPONSABILIDADES	42
VIII.	BIBLIOGRAFÍA.....	42



I. INTRODUCCIÓN

El manual de Procedimientos, constituye un complemento del manual de Organización y Funciones, formando y constituyendo ambos la documentación fundamental que sirve para dirigir, organizar y controlar los procesos del Servicio de Apoyo al Diagnóstico.

II. FINALIDAD

Establecer criterios normativos que aseguren el cumplimiento de los principios básicos de bioseguridad en el procedimiento de análisis bioquímico de rutina y especializado que contribuyan a la ayuda diagnóstica y a las acciones de salud integral de los pacientes en general.

III. OBJETIVOS

Normar los procedimientos de análisis bioquímico que permitan guiar y orientar para el trabajo de todo el personal del servicio de Apoyo al Diagnóstico del Hospital Víctor Larco Herrera.

IV. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Los procedimientos contenidos en el presente manual son de aplicación obligatoria para el personal de la Unidad de Laboratorio Clínico del servicio de Apoyo al Diagnóstico del Hospital Víctor Larco Herrera.

V. BASE LEGAL

- Ley N°26842, Ley General de Salud y sus modificatorias.
- Decreto Supremo N°013-2006-SA aprueba el Reglamento de Establecimientos de Salud y Servicios Médicos de Apoyo.
- Resolución de secretaria de Gestión Pública N° 006-2018-PCM /SGP, que aprueba la Norma Técnica N° 001-2018-SGP, Norma Técnica para la implementación de la gestión por procesos en las entidades de la administración pública.
- Resolución Jefatural N° 478-2005-J-OPE/INS, que aprueba el documento normativo MAN-INS-001, "Manual de Bioseguridad en Laboratorios de Ensayos Clínicos, Biomédicos y Clínicos", Serie de Normas Técnicas N° 18, 3ra. Edición.

VI. CONTENIDO

6.1 Definiciones

Según las normas ISO Norma ISO 15189:2012.

Muestra

Una o más partes tomadas de una muestra primaria.

Ejemplo: Un volumen de suero tomado de un volumen mayor de suero.

Análisis

Conjunto de operaciones cuyo objetivo es determinar el valor o las características de una propiedad.

Los análisis de laboratorio que determinan un valor de una propiedad se denominan análisis cuantitativos, aquellos que determinan las características de una propiedad se denominan análisis cualitativos. Asimismo, los análisis de laboratorio también se denominan a menudo analíticas o ensayos.

Plazo de respuesta



Es el tiempo transcurrido entre dos momentos especificados durante los procesos preanalítico, analítico y postanalítico.

Verificación

Confirmación mediante la aportación de evidencia objetiva, de que se han cumplido los requisitos especificados.

6.2 Tipos de Pruebas Bioquímicas

- Ácido úrico
- Alanina Aminotransferasa
- Aspartato Aminotransferasa
- Albumina
- Bilirrubinas Totales y Fraccionadas (Método de Jendrasick)
- Colesterol - Método CHOD-PAP-Enzimático
- Colesterol HDL - Colesterol de Alta Densidad
- Colesterol LDL - Colesterol de Baja Densidad
- Creatinina (Método de Jaffe sin desproteinizar)
- Depuración de Creatinina
- Creatina quinasa (CK ó CPK)
- Glucosa (Método de la Glucosa Oxidasa)
- Triglicéridos (Método Enzimático)
- Urea (Método Enzimático)
- Fosfatasa Alcalina (ALP)
- Gamma glutamil transferasa
- Tolerancia a la Glucosa
- Proteínas Totales



6.3 Descripción del Tipo de Ensayo

Las concentraciones de los analitos bioquímicos están en función a la metodología empleada para su cuantificación. Generalmente las pruebas tienen una relación directamente proporcional, es decir, cuando tienen una mayor lectura presentan mayor concentración o actividad enzimática. Estas metodologías pueden ser colorimétricas, cinéticas, potenciométricas (Ver Inserto de Pruebas)



6.4 Parámetros y Magnitudes e Intervalos de Medición

Los parámetros, magnitudes y los intervalos de medición son determinados en base a los datos contenidos en los instructivos de trabajo del fabricante (insertos de pruebas).

Parámetros	Unidades	Intervalos de Medición
Bilirrubina Total	mg/dl	Hasta 1.2
Bilirrubina Directa	mg/dl	Hasta 0.3
Glucosa	mg/dl	Hasta 110
Creatinina	mg/dl	Hasta 1.4
Proteínas totales	g/dl	Hasta 8
Albumina	g/dl	Hasta 5
Úrea	mg/dl	Hasta 50
TGP	U/L	Hasta 36
TGO	U/L	Hasta 40
CPK Total	U/L	Hasta 280
Ácido úrico	mg/dl	Hasta 7
Colesterol total	mg/dl	Hasta 200
Colesterol HDL	mg/dl	Hasta 40
Triglicéridos	mg/dl	Hasta 160
Fosfatasa alcalina	U/L	Hasta 270
Gamma glutamil transferasa	U/L	Hasta 40
Electrolitos (Sodio)	mmol/L	135 - 148
Electrolitos (Potasio)	mmol/L	3.5 - 5.3
Electrolitos (Cloro)	mmol/L	98 - 107

6.5 Equipos, Reactivos y Consumibles

Equipos: CB 350i

Reactivos: Específico para cada prueba (ver Insertos de Prueba).

Cada equipo "Kit" comercial contiene reactivos estables ya sea a temperatura ambiente o en refrigeración de 2 a 10°C hasta la fecha de su vencimiento.

No se debe almacenar a temperatura fuera de estos intervalos.



Consumibles

- Estándar: solución para calibración.
- Material de Control: Pueden ser controles internos o controles de tercera opinión. Se debe procesar como mínimo 2 niveles de control (Normal y patológico).
- Solución salina (0.85 – 0.90% NaCl) para dilución de muestras.

Para verificar el control de inventarios de reactivos y consumibles referirse al registro inventario de reactivos y consumibles.

Materiales de Referencia

Calibrador

Condiciones Ambientales y de Seguridad

Las instalaciones permiten el correcto desempeño de los exámenes, a través de adecuadas fuentes de energía, iluminación, ventilación, agua, disposición de residuos y condiciones ambientales de temperatura y humedad (Ver control de temperatura y humedad).

Para asegurar la calidad, seguridad y eficacia del servicio, las instalaciones del laboratorio tienen accesos controlados para mantener confidencialidad de la información, muestras, estudios y resultados para todos nuestros pacientes o clientes, controlando el acceso del personal a áreas donde se procesan muestras y se generan registros y con ello garantizar la seguridad, confidencialidad y resguardo de datos, equipos, registros e información diversa.

Tipo de Muestra

Para el procesamiento de las pruebas bioquímicas generalmente se emplea suero o plasma. Para los tipos de muestras específicas referirse al inserto de pruebas.

Las muestras se obtienen por venopunción obteniendo aprox. 3 ml de sangre total sin anticoagulante. Se separa el suero o plasma dentro de las 2 horas posteriores a la recolección.

Muestra estable en refrigeración entre 2-8° C, durante 3 días. Las muestras no deben contener fibrina ni estar hemolizadas. Compruebe que no haya burbujas en las muestras antes de su procesamiento.

Tipo de Tubos o Contenedores

- Tubo tapa rojo o gel separador
- Contenedor de orina 24 horas

Preparación del Paciente

Existen algunas pruebas que requieren condiciones de ayuno para el paciente como, por ejemplo: glucosa, perfil lipídico; sin embargo, otras pruebas no requieren dicha condición. Para ver más detalles sobre la preparación del paciente referirse a los insertos de las pruebas.

Criterios de Aceptación / Rechazo de Muestras

Los criterios o requisitos para la aceptación o rechazo de muestras se establecen en Manual de Toma de Muestra, no sin antes realizar una aclaración al cliente de todas aquellas muestras que no cumplan con los criterios o requisitos establecidos.



6.6 Procedimiento de Calibración de Equipos

Existen dos (2) tipos de calibraciones, las calibraciones analíticas y las calibraciones metrológicas.

Para el procedimiento de calibración metrológica del equipo referirse al procedimiento Calibración de Equipos de Laboratorio y en el caso de una calibración analítica referirse al manual de operación del equipo o instrumento, o al instructivo de trabajo específico.

Operación del Analizador

- Si el equipo se encuentra apagado, pulsar el botón de encendido en la parte trasera del equipo.
- Encender el monitor.
- Revisar que existan niveles adecuados de soluciones para el equipo CB 350i (presionando tecla F10). Cambiar solo en caso necesario.
- Eliminar desechos (ver Manual del equipo CB 350i apartado Procedimiento operativo).
- Realizar el mantenimiento diario del equipo.
- Limpieza externa del equipo
- Revisar reactivos a bordo y actualizar inventarios.
- Realizar calibraciones si es necesario.
- Programar en lista de trabajo los controles para las pruebas. Las funciones "Analizar Estándares" y "Analizar Controles" están disponibles en el menú principal "Tests" o través del ícono específico que ofrece el acceso directo.
- Revisar resultados de control de acuerdo al instructivo Evaluación del Control de Calidad Interno.
- Una vez validadas las curvas de calibración y controles, se procede a procesar las muestras de pacientes.
- En caso necesario referirse al manual de operación del equipo CB 350i.

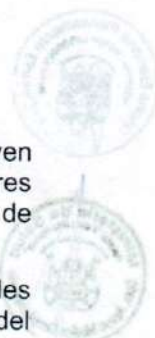
Procedimiento Técnico del Equipo

- El equipo tiene un plato giratorio donde se colocan las muestras y son trasladadas al punto de aspiración.
- Aspira y transfiere la muestra a la cubeta de reacción (CR).
- Dispensa el reactivo de trabajo en la CR.
- Mezcla, incuba y realiza la lectura fotométrica.
- Mide la absorbancia para determinar la cantidad y/o actividad del analito en la muestra.
- Aspira el contenido de la CR y lo transporta al recipiente de desechos líquidos.

6.7 Procedimientos de Control de Calidad

Para asegurar un adecuado control de calidad y resultados confiables, se incluyen como mínimo dos niveles de control: Control Nivel 1 y Control Nivel 2 con valores conocidos que son manejados como muestras desconocidas. Ver instructivo de Planificación del Control de Calidad Interno.

En la medida posible trabajar con controles de tercera opinión (controles interlaboratorio), si esto no es posible, se puede optar por los controles internos del mismo fabricante.



Es recomendable que el laboratorio participe en Programas de Evaluación Externa de Calidad (PEEC) y realice el análisis respectivo de los informes. Ver el instructivo Seguimiento del Programa de Evaluación Externa de la Calidad.

Todo desvío presentado, ya sea en el control interno o externo será identificado como un No Conforme y se llevará el registro y seguimiento respectivo (Ver Seguimiento de No Conformes).

Interferencias o Reacciones Cruzadas

Cada análisis puede verse afectado por interferentes o reacciones cruzadas propias del contenido de las muestras. Para mayores detalles consulte los insertos de pruebas.

Intervalos Biológicos de Referencia

Los procedimientos e intervalos biológicos de referencia se revisan tal cual lo establecen los insertos de las pruebas:

Parámetros	Intervalos de Referencia	Unidades
Bilirrubina Total	Adultos: Hasta 1.2	mg/dl
Bilirrubina Directa	Adultos: Hasta 0.3	mg/dl
Glucosa	Adultos: 60-110	mg/dl
Creatinina	0.6-1.4	mg/dl
Proteínas totales	6.0-8.0	g/dl
Albumina	3.5-5.0	g/dl
Urea	10-50	mg/dl
TGP	Hasta 36	U/L
TGO	Hasta 40	U/L
CPK Total	Hasta 195	U/L
Ácido úrico	3.5-7.2	mg/dl
Colesterol total	Deseable <200	mg/dl
Colesterol HDL	40-60	mg/dl
Triglicéridos	Deseable <160	mg/dl
Fosfatasa alcalina	65-300	U/L
Gamma glutamil transferasa	11-50	U/L
Electrolitos (Sodio)	135-148	mmol/L
Electrolitos (Potasio)	3.5-5.3	mmol/L
Electrolitos (Cloro)	98-107	mmol/L

Valores de Alerta o Críticos

La detección, la notificación y el seguimiento de los valores de alerta/críticos y límites de decisión clínica se determinan utilizando los criterios establecidos en el procedimiento Notificación de Valores Críticos.

Datos a ser Registrados en el Informe de Pacientes

Para la emisión completa de los resultados a los pacientes referirse al procedimiento Informe de Resultados.

Precauciones de Seguridad

- No se mezclan reactivos de lotes diferentes.
- No se usa el kit después de la fecha de caducidad
- Se utiliza guantes de látex desechables.
- Se utiliza bata blanca bien abotonada.



- Los reactivos deben almacenarse en posición vertical.
- Referirse a la ficha técnica del reactivo (inserto).
- Se desechan todas las muestras usadas como desechos biológicos infecciosos.

Fuentes Potenciales de Variabilidad

Se contempla todas aquellas que puedan generar variabilidad en las mediciones como pueden ser las condiciones según la edad, por enfermedad, por terapias con ciertas drogas, etc. Para mayores detalles referirse a los insertos de las pruebas.

6.8 Pruebas

El servicio de Bioquímica del Dpto. Laboratorio de acuerdo a su MOF y al MAPRO tiene cuatro secciones o sectores de trabajo en las cuales los Tecnólogos Médicos encargados de dicha sección de acuerdo al rol establecido mensual, los Médicos Patólogos Clínicos del servicio, procesarán las siguientes pruebas que a continuación detallamos:

Pruebas Bioquímicas Manuales

En esta sección se llevan a cabo las determinaciones analíticas empleando tubos de ensayo pipetas de vidrio, pipetas graduables de rango fijo y variable, gradillas, etc. Empleándose para ello reactivos estandarizados según los métodos bioquímicos convencionales.

Para el procesamiento en serie se cuenta con cartillas con una serie de valores numéricos obtenidos teniendo en cuenta el factor colorimétrico y las lecturas de fotómetros o espectrofotómetros analógicos o digitales, las cuales aparecen en las pantallas de los mismos equipos.

Las sustancias conocidas sirven como patrón para luego establecer la llamada curva de calibración, de este modo se establecen parámetros que son fundamentales para el control de calidad, teniendo en cuenta que algunas de las pruebas son procesadas empleando Kits autorizados por marcas reconocidas a nivel nacional y mundial.

Urianálisis y Pruebas Especiales de Orina

En esta sección se realizan los exámenes completos de orina, la cual comprende realizar el examen físico, químico y de sedimento urinario además se realizan las pruebas funcionales de orina, generalmente en orina de 24 horas como son la depuración de Creatinina, Proteinuria, Ac. Úrico, calcio, fósforo y otras pruebas especiales de orina.

Especiales

Es la sección en donde se procesan y realizan procedimientos analíticos especiales, los cuales requieren de un mayor conocimiento y entrenamiento del personal de servicio, comprende las pruebas y exámenes citoquímicos de los líquidos de punción (Liq. Pleural, Liq. Ascítico o peritoneal, Liq. Pericárdico), LCR, Liq. Amniótico, examen completo del líquido seminal o espermatograma, pruebas cualitativas de Diagnóstico precoz del embarazo.

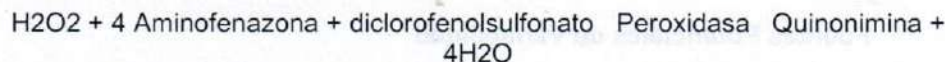
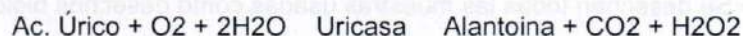
6.8.1 Dosaje de Ácido Úrico

Definición

El ácido úrico es oxidado enzimáticamente por la uricasa a alantoina con producción de dióxido de carbono y agua oxigenada. El agua oxigenada originada en la oxidación produce la copulación oxidativa de la 4 aminofenazona

con un aceptor mediante una reacción catalizada por la peroxidasa dando lugar a la formación de una quinonimina roja con absorbancia a 505 nm.

Fundamento



Las nucleoproteínas están presentes en todas las células y las purinas son el producto de su degradación, cuyo producto terminal más importante es el Ácido úrico. Su fuente principal son las nucleoproteínas de la dieta, especialmente de la carne.

Objetivos

Determinar los niveles en sangre y/o orina de 24 horas, la concentración del Ac. Úrico circulante y su relación con algún cuadro patológico o descartarlo.

Responsabilidad

Esta prueba se realiza en la sección de pruebas bioquímicas en equipos automatizados y las muestras de orina en la sección de orina y especiales. El personal tecnólogo médico, encargado de la sección es el responsable de realizar el procedimiento de acuerdo a las normas establecidas.

Materiales y Equipos

- Muestra; suero o plasma, orina de 24 horas, dieta libre de carnes por tres días.
- Recolección; Obtener suero o plasma de la manera usual, separar el coagulo lo antes posible, dentro de las 2 horas contadas de la recolección.
- Aditivos; en caso que la muestra a emplear sea plasma, se recomienda el uso de heparina o EDTA para su obtención.
- Estabilidad de la muestra y almacenamiento; emplear suero fresco para el examen, en caso de no poderlo realizar guardar en el congelador hasta 3 días.

Orientación Técnica, Técnica de Punto Final.

Técnica Manual

- Preparar el reactivo de acuerdo a las indicaciones del fabricante.
- Dejar atemperar el reactivo durante unos minutos a temperatura ambiente.
- Procedimiento, Pipetear en tubos de ensayo.

	Blanco	Estándar	Muestra
Reactivo Ac. Úrico	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml
Estándar		20 ul	
Muestra			20 ul

- Agitar bien e incubar en BM a 37° C por 5 minutos, retirar, dejar enfriar y leer.
- Anotar las observancias del estándar y la muestra fuente al blanco a 505 nm.



- El color de la reacción final es estable por 30 minutos, por lo que debe de ser leída antes de este tiempo.
- Realizar el siguiente cálculo

$$\frac{\text{Abs. Muestra} \times \text{Concent. St. mg/dl}}{\text{Abs. estandar}} \times \frac{\text{Ac. Urico(mg/dl)} \times \text{Vol. Orina 24 h (ml)} \times 10}{100} = \text{mg/24 h (Orina)}$$

Técnica en Equipo Analizador Automático

Tabla 1. Valor de Referencia

Niños	Varones	Mujeres
2.0-5.5 mg/dl	3.4-7.0 mg/dl	2.4-5.7 mg/dl
Orina 250-750 mg/24 horas		

Interferencia e Implicancia Clínica

Sustancias interferentes conocidas: Sueros ictericos (bilirrubina mayor de 12 mg/dl) o con hemólisis visible no deben de ser usados. Medicamentos: Ácido ascórbico por ser fuertemente reductor, Buscapina por interferir con la reacción.

El ácido úrico es un metabolito de las purinas, ácidos nucleicos y nucleoproteínas. Habitualmente la concentración de ácido úrico en suero varía de un individuo a otro de acuerdo a diversos factores como: sexo, dieta, origen étnico, constitución genética, embarazo.

Niveles anormales de ácido úrico en suero son índice de desorden en el metabolismo de las sustancias que lo originan o defectos en su eliminación.

Aumentado

Mieloma múltiple, Leucemia, Policitemia, irradiaciones profundas en tratamientos citostáticos. Insuficiencia renal, insuficiencia congestiva.

6.8.2 Alanina Aminotransferasa

Definición

Las transaminasas son enzimas representadas por proteínas simples conjugadas o sintetizadas por células de diferentes tejidos: hepático, miocardio, renal, nerviosa y músculo estriado. Las cantidades de estas enzimas son tan pequeñas que no permiten la determinación cuantitativa en miligramos o miliequivalentes, por lo que se expresan en unidades.

Fundamento

Alanina + 2 Oxoglutarato $\xrightarrow{\text{ALT}}$ Piruvato + Glutamato
 Piruvato + NADH + H $\xrightarrow{\text{LDH}}$ Lactato + NAD

Medida de la tasa de desaparición del NADH



Objetivo

Determinar los niveles en sangre la actividad enzimática de la ALT (TGP) circulante y su relación con algún cuadro patológico o descartarlo.

Responsabilidad

Esta prueba se realiza en la sección de pruebas bioquímicas en equipos automatizados y en la sección de pruebas manuales. El Tecnólogo Médico encargado de la sección es el responsable de realizar el procedimiento de acuerdo a las normas establecidas en coordinación con la coordinadora de Tecnólogos Médicos del Servicio.

Materiales y Equipos

Muestra; suero

Recolección; obtener suero o plasma de la manera usual, separar el coágulo lo más posible, dentro de las 2 horas contadas de la recolección.

Materiales; estos son:

- Tubos de 12 x 75 o 13 x 100 mm.
- Pipetas automáticas de 100 ul y de 1000 ul.
- Espectrofotómetro digital o analizador semiautomatizado.
- Reactivo ALT cinético.

6.8.3 Aspartato Aminotransferasa

Definición

Las transaminasas son enzimas representadas por proteínas simples, conjugadas o sintetizadas por células de diferentes tejidos: hepático, renal, miocárdico, nervioso y músculo estriado. Las cantidades de estas enzimas son tan pequeñas que no permiten la determinación cuantitativa en miligramos o milimoles, por lo que se expresan en Unidades. En el hepatocito la AST se encuentra tanto en el citoplasma como en las mitocondrias. En el suero abunda más la AST que la ALT. También se encuentra en la epidermis de la piel, miocardio, músculo estriado, páncreas y riñones. Los glóbulos rojos contienen unas 10 veces más AST que el suero.

Fundamento

Aspartato + 2 Oxoglutarato AST Oxalato + Glutamato

Oxalato + NADH MDH Malato + NAD

Objetivos

Determinar los niveles en sangre de la actividad enzimática de la TGO AST circulante y su relación con algún cuadro patológico o descartarlo.

Responsabilidad

Esta prueba se realiza en la sección de pruebas bioquímicas en equipos automatizados y en la sección de pruebas manuales. El Tecnólogo Médico encargado de la sección es el responsable de realizar el procedimiento de acuerdo a las normas establecidas en coordinación con la coordinadora de Tecnólogos Médicos del Servicio.



Materiales y Equipos

Muestra, suero

Recolección, obtener suero o plasma de la manera usual, separar el coágulo lo antes posible, dentro de las 2 horas contadas de la recolección.

Materiales, estos son:

- Tubos de 12 x 75 o 13 x 100 mm.
- Pipetas automáticas de 100 ul y de 1000 ul.
- Espectrofotómetro digital o analizador semiautomatizado.
- Reactivo AST cinético.

Orientación Técnica, Reconstituir el reactivo de acuerdo a instrucciones del fabricante

Técnica Manual

- Precalentar el reactivo a 37°C por unos minutos.
- Pipetear en tubos de ensayo precalentados a 37°C por 5 min.

Reactivos de trabajo 1ml

Muestra 100 ul

- Agitar bien e incubar a 37°C por 60 segundos.
- Calibre el 0 del espectrofotómetro a 340 nm con el blanco (agua destilada).
- Al cabo de un minuto, anotar la Absorbancia inicial de la muestra y efectuar nuevas lecturas cada minuto durante 3 minutos.
- Comprobar que las diferencias entre absorbancias sean sensiblemente iguales.

$ABS / MIN \times 1768 - UL$

- Si el valor es mayor a 500 U/L hacer diluciones iguales con agua destilada y multiplicar el valor obtenido por la dilución.

Técnica en Equipo Analizador Automático

Valor de Referencia

0 – 40 U/L (37°)

Interferencia e Implicancia Clínica

Aumentado

Infarto de miocardio, hepatitis viral, mononucleosis, obstrucción hepatobiliar, cirrosis, metástasis hepática, pancreatitis aguda, anemia hemolítica e infección renal.

Disminuido

Baja nutrición con piridoxina, mujeres con anticonceptivos orales, hemodiálisis.



6.8.4 Albumina

Definición

La albúmina es una fracción proteica que se forma en el hígado y cuyas funciones primordiales son el transporte de diferentes elementos y sostén de la presión oncótica.

Fundamento

Albumina + Verde de Bromocresol – Complejo coloreado

Objetivo

Cuantificar mediante esta metodología la cantidad de albúmina presente en las muestras de sangre (suero y plasma heparinizado) que se procesen.

Responsabilidad

Los Tecnólogos Médicos son los responsables de la realización de este procedimiento; el Tecnólogo Médico coordinador es el responsable que esto se realice bajo los estándares del Laboratorio y el Jefe del Servicio es el responsable del control periódico del procedimiento.

Materiales y Equipos

Muestra; suero o plasma heparinizado

Recolección; obtener suero o plasma de la manera usual, separar el coágulo lo antes posible, dentro de las 2 horas contadas de la recolección.

Materiales; estos son:

- Tubos de 13 x 100 mm o de 12 x 75 mm.
- Pipetas automáticas de 10 ul y de 1000 ul.
- Espectrofotómetro o analizador semiautomatizado.
- Reactivo de albúmina (VBC).
- Reloj o timer.

Orientación Técnica

Técnica Manual

- Pipetear en tubos de ensayo

Reactivos de trabajo 1ml

Muestra 100 ml

- Agitar bien y dejar en reposo a temperatura ambiente por 5 min.
- Calibre el cero del espectrofotómetro a 620 nm con el blanco de reactivo.
- Leer la absorbancia del estándar de la muestra. No dejar pasar más de 30 minutos.
- Realizar el siguiente cálculo.

$\text{Abs. Muestra} \times \text{Conc. Estándar} = (\text{Muestra}) \text{ g/dl}$

Abs. Estandar



Técnica en Equipo Analizador Automático

Seguir procedimiento indicado.

Interferencia e Implicancia Clínica

No se observan interferencias por:

Hemólisis moderada

Bilirrubinemia hasta 20 mg/dl

Lipemia hasta 2000 mg/dl

Aumentado

No existe.

Disminuido

Por pérdidas cuantiosas (Hemorragias, albuminuria persistente, paracentesis, catabolismo excesivo) por síntesis defectuosa (Hepatopatías), y por carencia de materia prima (hipoalimentación).

6.8.5 Bilirrubinas Totales y Fraccionadas (Método de Jendrasick)

Definición

La bilirrubinemia indica la cantidad total que circula en el organismo y es el responsable del tinte amarillo que toma la piel cuando sus niveles se elevan. Corresponde a la suma de dos variedades. Es un producto de la hemoglobina y se forma en las células del reticuloendotelial. Una parte se transporta hacia el hígado, se conjuga con el ácido glucurónico y se excreta en el duodeno el cual se denomina bilirrubina directa. La fracción que no es conjugada se denomina bilirrubina indirecta.

Fundamento

La bilirrubina reacciona con el ácido Sulfanílico diazoadado en medio ácido, originando un complejo coloreado. El dimetil sulfóxido solubiliza la bilirrubina indirecta (no conjugada) permitiendo su reacción junto con la fracción directa (conjugada).

Objetivo

Medir la concentración de Bilirrubina total y fraccionada presente en las muestras de sangre (suero) que se procesen en el servicio de Bioquímica.

Responsabilidad

Los Tecnólogos médicos de la sección correspondiente, son los responsables de la realización de este procedimiento, se realiza bajo los estándares del Laboratorio y el jefe del servicio es el responsable del control periódico del procedimiento.

Materiales y Equipos

Muestra, suero (también en líquido amniótico)

Recolección; obtener suero o plasma de la manera usual, separar el coágulo lo antes posible, dentro de las 2 horas contadas de la recolección. Proteger de la luz artificial o natural. Colocar en frasco oscuro o envolverlo en papel negro.

Materiales, estos son:



- Tubos de 13 x 100 o de 16 x 150 mm
- Pipetas automáticas de 100 ul de 1000 ul.
- Espectrofotómetro digital o analizador semiautomatizado.
- Reloj o timer.
- Reactivos para el procesamiento de bilirrubina.

Orientación Técnica

Reconstituir el reactivo de acuerdo a instrucciones.

Técnica Manual

- Pipetear en tubos de ensayo

	Blanco	Directo	Total
Suero	100 ul	100 ul	100 ul
Agua destilada	2.0 ml	2.0 ml	
Cafeína			2.0 ml
Ac. Sulfanílico	0.25 ml		
Diazoreactivo (*)		0.25 ml	0.25 ml

(*) Prepara antes de realizar la prueba: 1.5 ml Ac. Sulfanílico +0.1 ml de nitrito de sodio al 0.5%

- Mezclar y dejar en reposo por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Calibre el cero del espectrofotómetro a 540 nm con el blanco.
- Anotar la absorbancia y calcular:

Abs. X FACTOR mg/dl

Técnica en Equipo Analizador Automático

Valor de Referencia

Bilirrubina Total : 0.20 – 1.20 Mg/Dl

Bilirrubina Directa : 0.20 – 0.80 Mg/Dl

Bilirrubina Indirecta : 0 – 0.40 mg/dl

Interferencia e Implicancia Clínica

Hemólisis moderada o intensa inhiben la reacción directa, obteniéndose valores de bilirrubina total falsamente aumentados.

Aumentado

-Bilirrubina directa: Ictericias, hepatitis, congestión cardiaca, cirrosis hepática, enfermedades vesiculares, carcinoma del páncreas.

-Bilirrubina Indirecta: Anemias hemolíticas.



6.8.6 Colesterol – Método CHOD-PAP-Enzimático

Definición

El colesterol es una sustancia indispensable en la formación de paredes celulares, síntesis de hormonas femeninas (estrógenos) el principal componente de la bilis, catalizador activo en intercambios celulares e interviene activamente en la síntesis de andrógenos. Fisiológicamente se compone de 3 lipoproteínas que se denominan según su densidad. Las de muy baja (VLDL) constituye en un 52% de triglicéridos y son materia prima para fabricar la fracción de baja densidad (LDL) que son propuestas a quedarse dentro de la capa íntima de la arteria y que origina la arterioesclerosis. La otra es la de alta densidad (HDL) que tiene como función que la escoba barredora que trata de eliminar los desechos de su hermana LDL.

Fundamento

Tanto el colesterol libre como el esterificado presente en la muestra, originan según las reacciones acopladas descritas a continuación, un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría.

Colesterol esterificado + H₂O COL ESTERASA Colesterol + Ácido graso

Colesterol + ½ O₂ + H₂O COL OXIDASA Colestonona + H₂O₂

2 H₂O₂ + 4 Aminoantipirina + Fenol PEROXIDASA Quinonaimina + 4H₂O₂

Objetivo

Medir la concentración del colesterol sérico total presente en las muestras de sangre (suero) que se procesen en el servicio de bioquímica.

Responsabilidad

Los tecnólogos médicos de la sección correspondiente son los responsables de la realización de este procedimiento se realice bajo los estándares del laboratorio y el Jefe de servicio es el responsable del control periódico del procesamiento.

Materiales y Equipos

Muestra; suero

Recolección; obtener suero de la manera usual, separar el coagulo lo antes posible dentro de las 2 horas contadas de la recolección.

Materiales; estos son:

- Tubos de 13 x 100 o de 16 x 150 mm.
- Pipetas automáticas de 10 ul y de 1000 ul.
- Espectrofotómetro digital o Analizador semiautomatizado.
- Reloj o timer.
- Reactivos para procesamiento de colesterol.

Orientación Técnica; reconstituir el reactivo de acuerdo a instrucciones.

Técnica Manual; de punto final.

- Pipetear en tubos de ensayo:



	Blanco	Estándar	Muestra
Estándar (200 mg/dl)	-	10 ul	-
Muestra	-	-	10 ul
Reactivo Trabajo (*)	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

(*) Mezclar un ml de reactivo B (colesterol esterasa 5 u/ml + colesterol oxidasa 2u/ml + peroxidasa 20 u/ml + 4-aminoantipirina 12.5 mmol/L) y 24 ml de reactivo A (píipes 35 + colato sódico 0.5 mmol/L + fenol 28 mmol/L, pH 7.0).

- Mezclar y dejar en reposo por 10 min. A temperatura ambiente o 5 min. A 37°C.
- Calibre el cero del espectrofotómetro a 505 nm con el blanco.
- Anotar la absorbancia y calcular:

Abs. Muestra x 200 mg/dl

Abs. Estándar

$\text{Mg/dl colesterol} \times 0.0259 = \text{mmol/L colesterol}$

Técnica en Equipo Analizador Automático

Seguir el procedimiento indicado

Valores de Referencia

Tabla 2. Valores de Referencia (mg/dl)

Edad	Hombres	Mujeres
5-19	110-155	120-160
20-25	125-165	125-170
26-35	130-178	130-176
36-40	140-200	140-180
41-45	145-205	145-195
46-70	160-220	170-230
70	150-205	170-230



Interferencia e Implicancia Clínica

Interferencias

- Excepto la heparina, los anticoagulantes comunes interfieren en la reacción
- Los sueros con hemólisis intensa o visible producen valores falsamente elevados por lo que no deben ser usados
- En sueros fuertemente hiperlipémicos puede observarse turbiedad, tal caso diluir el volumen final de reacción al $\frac{1}{2}$ o $\frac{1}{3}$ con el blanco de reactivos, repetir la lectura y multiplicar el resultado por el factor de dilución
- No se observan interferencias por bilirrubina hasta 20 mg/dl, ni hemólisis ligera.

Implicancia Clínica

Tabla 3. Valores de Referencia (mg/dl)

Edad	Riesgo Moderado	Riesgo Alto
2-20	165	180
21-30	200	220
31-40	220	240
40	240	260

6.8.7 Colesterol HDL – Colesterol de Alta Densidad

Definición

El HDL colesterol es una de las fracciones de la molécula del colesterol y entra en la proporción del 17 %. Es la que contrarresta la acción nociva que pueda tener el LDL sobre nuestro organismo, al evitar la aterosclerosis excesiva, si ella no estuviera presente. Saca del organismo los depósitos de la LDL y con ayuda de la lecitina – acetil – transferasa, elimina por la bilis cantidades considerables de LDL en forma de ácidos biliares y esteroides neutros.

Fundamento

Los quilomicrones y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de baja densidad (LDL) presentes en la muestra precipitan en presencia del fosfotungstato y iones magnesio. El sobrenadante de la centrifugación contiene las lipoproteínas de elevada densidad (HDL) cuyo colesterol se cuantifica por espectrofotometría mediante las siguientes reacciones acopladas:

Colesterol esterificado + H₂O COL ESTERASA Colesterol + Ácido graso

Colesterol + $\frac{1}{2}$ O₂ + H₂O COL OXIDASA Colestonona + H₂O₂

2 H₂O₂ + 4 Aminoantipirina + DCFS PEROXIDASA Quinonaimina + 4H₂O

Objetivo

Medir la concentración del colesterol HDL presente en las muestras de sangre (suero) que se procesen.



Responsabilidad

Los tecnólogos médicos de la sección correspondiente son los responsables de la realización de este procedimiento estándares del laboratorio y el Jefe de servicio es el responsable del control periódico del procesamiento.

Materiales y Equipos

Muestra; suero

Recolección; obtener suero de la manera usual, separar el coagulo lo antes posible dentro de las 2 horas contadas de la recolección.

Materiales; estos son:

- Tubos de 13 x 100 o de 12 x 150 mm.
- Pipetas automáticas de 10 ul y de 1000 ul.
- Espectrofotómetro digital o Analizador semiautomatizado.
- Reloj o timer.
- Reactivos para procesamiento de colesterol.

Orientación Técnica

Reconstituir el reactivo de acuerdo a instrucciones.

Técnica Manual

- Pipetear en tubo, agitar y dejar en reposo por 10 minutos a temperatura ambiente.

Muestra	
Muestra	100 ul
Reactivo Precipitante (*)	0.5 ul

(*) Fosfotungstato 1.5 mmol/L, Acetato de magnesio 60 mmol/L

- Centrifugar durante 10 minutos a un mínimo de 4000 r.p.m.
- Recoger el sobrenadante y pipetear en tubos de ensayo según el cuadro siguiente:

	Blanco	Estándar	Muestra
Agua Destilada	100 ul	-	-
Estándar HDL - C	-	100 ul	-
Sobrenadante	-	-	100 ul
Reactivo Trabajo (*)	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

(*) Mezclar un ml de reactivo B (colesterol esterasa 5 u/ml + colesterol oxidasa 2u/ml + peroxidasa 20 u/ml + 4-aminoantipirina 12.5 mmol/L) y 24 ml de reactivo A (pipes 35 + colato sódico 0.5 mmol/L + fenol 28 mmol/L, pH 7.0).



- Mezclar y dejar en reposo por 10 min. A 37°C.
- Calibre el cero del espectrofotómetro a 505 nm con el blanco.
El color es estable durante 30 minutos.
- Anotar la absorbancia y calcular:

Abs. Muestra x 200 mg/dl

Abs. Estandar

Mg/dl colesterol x 0.0259 = mmol/L colesterol

Técnica en Equipo Analizador Automático

Valor de Referencia

Edad	Hombres	Mujeres
5-15	54	51
26-20	46	50
21-30	45	54
31-40	44	52
41-50	45	57
51-60	46	59
61-70	49	61
71-80	48	60

Interferencia e Implicancia Clínica

Interferencias

- Excepto la heparina, los anticoagulantes comunes interfieren en la reacción
- Los sueros con hemólisis intensa o visible producen valores falsamente elevados por lo que no deben ser usados.
- En sueros fuertemente hiperlipémicos puede observarse turbiedad, tal caso diluir el volumen final de reacción al 1/2 o 1/3 con el blanco de reactivos, repetir la lectura y multiplicar el resultado por el factor de dilución.
- No se observan interferencias por bilirrubina hasta 20 mg/dl, Ácido ascórbico hasta 7.5 mg/dl, ácido úrico hasta 20 mg/dl, ni hemólisis ligera.



Implicancia Clínica

Para el organismo es muy beneficioso tener un índice elevado de HDL, puesto que al relacionarlo matemáticamente con el HDL se obtiene lo que se denomina Índice Aterógeno o Índice Arterial que es la relación entre LDL y HDL que origina un índice igual a 4 cifras superiores indican envejecimiento acelerado debido al mayor depósito de LDL y por lo tanto, mayor arteriosclerosis. Cifras inferiores a 4 nos indican que estamos envejeciendo normalmente.

6.8.8 Colesterol LDL – Colesterol de Baja Densidad

Definición

El LDL colesterol es una de las fracciones de la molécula del colesterol y entra en la proporción del 50 %. Son producto del metabolismo de las VLDL en plasma son las encargadas del transporte del Colesterol (exógeno y en menor proporción del endógeno) hacia el interior de las células. Un exceso de colesterol LDL debe ser considerado como factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad cardíaca coronaria.

Fundamento

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL o Beta lipoproteínas) se separan del suero precipitándolas selectivamente mediante el agregado de polímeros de alto peso molecular, luego de centrifugar, en el sobrenadante las demás lipoproteínas (HDL y VLDL); el colesterol ligado a las mismas se determina empleando el sistema enzimático Colesterol Oxidasa/peroxidasa con colorimetría según Trinder. Por diferencia entre el colesterol y el determinado en el sobrenadante, se obtiene el Colesterol unido a las LDL.

Objetivo

Medir la concentración del colesterol LDL presente en las muestras de sangre (suero) que se procesen en el servicio.

Responsabilidad

Los tecnólogos médicos de la sección correspondiente son los responsables de la realización de este procedimiento se realice bajo los estándares del laboratorio y el Jefe de servicio es el responsable del control periódico del procesamiento.

Materiales y Equipos

Muestra; suero (ayuno de 12 horas)

Recolección; obtener suero de la manera usual, separar el coagulo lo antes posible dentro de las 01 horas contadas de la recolección.

Materiales; estos son:

- Tubos de 13 x 100 o de 16 x 150 mm.
- Pipetas automáticas de 10 ul y de 1000 ul.
- Espectrofotómetro digital o Analizador semiautomatizado.
- Reloj o timer.
- Reactivos precipitantes LDL y para procesamiento de colesterol total.

Orientación Técnica

Reconstituir el reactivo de acuerdo a instrucciones.



Técnica Manual

- Pipetear en tubo, agitar y dejar en reposo por 15 minutos a temperatura ambiente

	Muestra
Muestra	200 ul
Reactivo Precipitante (*)	100 ul

(*) Solución 10 g/L de Sulfato de Polivinilo disuelto en polietilenglicol (PM.600) al 25% pH: 6.7

- Centrifugar durante 10 minutos a un mínimo de 4000 r.p.m. o 15 minutos a 3000 r.p.m.
- Recoger el sobrenadante y pipetear en tubos de ensayo según el cuadro siguiente:

	Blanco	Estándar	Muestra
Estándar (200 mg/dl)	-	10ul	-
Sobrenadante	-	-	50 ul
Reactivo Trabajo (*)	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

(*) Mezclar un ml de reactivo B (colesterol esterasa 5 u/ml + colesterol oxidasa 2u/ml + peroxidasa 20 u/ml + 4-aminoantipirina 12.5 mmol/L) y 24 ml de reactivo A (pípes 35 + colato sódico 0.5 mmol/L + fenol 28 mmol/L, pH 7.0).

- Agitar los tubos y dejar a 37°C por 10 minutos.
- Calibre el cero del espectrofotómetro a 505 nm con el blanco. El color es estable durante 30 minutos.
- Anotar la absorbancia y calcular el factor con la siguiente fórmula:

$$0.624 \quad \text{Cálculo de los resultados Col-HDL} = \text{Colest. Total} - (D \times F)$$

std

Técnica en Equipo Analizador Automático

Seguir el procedimiento indicado

Valores de Referencia

- Riesgo bajo o nulo (sujetos normales): menor de 140 mg/dl
- Riesgo moderado (personas con probabilidad de contraer ECC): entre 140 a 190 mg/dl



- Riesgo alto (personas sospechosas de padecer ECC): mayor de 190 mg/dl

Interferencia e Implicancia Clínica

Interferencias

- Los sueros hipertrigliceridémicos (con quilomicronemia) producen sobrenadantes turbios.
- La bilirrubina interfiere con niveles mayores de 5 mg/dl

Implicancia Clínica

Diversos estudios epidemiológicos han confirmado que el exceso de Colesterol-LDL, con respecto a su valor crítico (190 mg/dl) debe ser considerado como factor de riesgo para el desarrollo de ECC.

6.8.9 Creatinina (Método de Jaffe sin desproteinizar)

Definición

La creatinina se forma en los músculos a partir del fosfato de creatinina y un 2% de dicha sustancia se convierte diariamente en creatinina. Es excretada principalmente por los riñones y una pequeña cantidad parte con las heces. La creatinina no modifica su nivel en el suero, ni con la dieta, ejercicio, edad, sexo, ni procesos catabólicos.

Fundamento

La creatinina presente en la muestra reacciona con el picrato en medio alcalino originando un complejo coloreado.

Objetivo

Medir la concentración de creatinina presente en las muestras de sangre (suero) que se procesen en el servicio.

Responsabilidad

Los tecnólogos médicos de la sección correspondiente son los responsables de la realización de este procedimiento se realice bajo los estándares del laboratorio y el Jefe de servicio es el responsable del control periódico del procesamiento.

Materiales y Equipos

Muestra; recolección

Suero; obtener suero de la manera usual, separar el coagulo lo antes posible dentro de las 02 horas contadas de la recolección.

Orina; de 02 a 24 horas de recolección empleando un recipiente perfectamente limpio y manteniéndolo en el refrigerador (2 – 10 °C) durante la recolección.

Materiales; estos son:

- Tubos de 13 x 100 o de 16 x 150 mm.
- Pipetas automáticas de 10 ul y de 1000 ul.
- Espectrofotómetro digital o Analizador semiautomatizado.
- Reloj o timer.
- Reactivos para procesamiento de creatinina



Orientación Técnica; reconstituir el reactivo de acuerdo a instrucciones.

Técnica Manual; cinética.

- Precalentar el reactivo de trabajo a 37°C durante unos minutos.
- Calibre el cero del espectrofotómetro a 505 nm con el blanco de reactivo.
- * Mezclar volúmenes iguales de reactivo A (Ac. Plérico 25 mmol/L) y reactivo B (NaOH 0,2 mmol/L detergente)
- Pipetear en una cubeta precalentada a 37°C:

Reactivo Trabajo* 1.0 ml

Patrón ** o Muestra 100 ml

** Creatinina 2 mg/dl

- Mezclar y poner el contómetro en marcha de inmediato
- A los 30 segundos anotar la absorbancia (A1) y luego a los 90 segundos
- Calcular:

$$\frac{(A2 - A1) \text{ MUESTRAS} \times 2}{(A2 - A1) \text{ PATRON}} = \text{mg/dl}$$

Técnica en Equipo Analizador Automático

Seguir el procedimiento indicado

Valores de Referencia:

Hombres: 0.7 – 1.4 mg/dl

Mujeres: 0.6 – 1.2 mg/dl

Interferencia e Implicancia Clínica

Interferencias

Hemólisis ligera o moderada no interfiere

Implicancia Clínica

Aumentado

Nefritis aguda, nefrosis por tóxicos, insuficiencia cardiaca avanzada, obstrucciones urinarias, insuficiencia renal crónica.

6.8.10 Depuración de Creatinina

Introducción

El riñón es el órgano vital para mantener la homeostasis interna, el equilibrio hidroelectrolítico y el ácido-base, la presión arterial, el metabolismo de proteínas, purinas, calcio y fósforo y la producción de eritropoyetina; también interviene en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y de varias hormonas y oligoelementos, mediante múltiples procesos fisiológicos que se reflejan en la producción de orina en el periodo de 24 horas a través de la hemodinámica renal, cuyo parámetro fundamental es la filtración glomerular—valores



normales de 120 ± 15 mL/minuto (10 % menor en la mujer); sus niveles determinan las clasificaciones del grado o estadio de la insuficiencia renal crónica. La filtración glomerular decae con los años: en los adultos de más de 60 años se espera 50 % (60 mL/minuto) del parámetro de referencia. Ante un trasplante renal de riñón único, tanto en el receptor como en el donante vivo se espera un nivel similar, que sería el límite entre suficiencia e insuficiencia.

La elevación en sangre de la creatinina es un indicador de insuficiencia renal crónica: una elevación menor representa un decremento importante de la filtración glomerular, sobre todo en las etapas intermedias, es decir, la elevación de 2 a 4 mg/dL de creatinina sérica manifiesta una pérdida de más de 8 mL/minuto de filtración glomerular, lo cual es de mal pronóstico. Hay que señalar que ésta no se recupera una vez instalada la insuficiencia renal crónica, sino que va en constante descenso, de ahí que se habla de la reciprocidad de la creatinina, que se extrapola con el tiempo (meses). La enfermedad renal progresiva crónica es paralela a la fibrosis renal y a la disminución del tamaño de los riñones. Por debajo de 30 mL/minuto se inician los síntomas propios del estado urémico que puede evolucionar a—coma urémico y a muerte, a menos que el paciente ingrese a un programa de diálisis crónica o reciba un trasplante renal, que se indican cuando la filtración glomerular tiene valor por abajo de 5 a 10 % de los niveles normales.

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

Objetivos

- Conocer la fundamentación para la determinación de las pruebas de función renal
- Conocer el método de depuración de creatinina y su cálculo.
- Relacionar el resultado con el estado renal del paciente

Fundamento

La medición de la filtración glomerular indica el grado de funcionalidad del sistema renal. No obstante, el desarrollo de nuevas tecnologías, en la mayoría de los países, la técnica más apropiada y aceptada para medir la filtración glomerular es la depuración de creatinina en orina de 24 horas, que tiene la ventaja de ser confiable, fácil de reproducir, no tiene limitaciones técnicas y, sobre todo, es económica.



Metodología

Muestra biológica

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

Material

- 1 Micropipeta de 1,000 μL
- 1 Micropipeta de 200 μL .
- 1 Piseta con agua desionizada o destilada
- 2 Celdas de plástico de 3 ml.
- 5 Tubos de vidrio de 13X100 Puntas para micropipeta Gradilla.

Equipo

Espectrofotómetro o Fotómetro termostable a 37°C con filtro de 490-510 nm.

Centrífuga

Incubadora de agua o seca a 37°C

Reactivos

Utilizar el Kit de reactivos para creatinina por el método colorimétrico de Jaffé.

Cálculos

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

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

Donde:

U = creatinina en orina (mg/dL).

P = creatinina en plasma (mg/dL).

V = volumen urinario (mL/minuto), que se obtiene de dividir el volumen urinario colectado entre 1440 (no olvidar que los riñones en condiciones normales producen 1 mL de orina por minuto y el día completo tiene 1440 minutos).

Ejemplo:

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



Fórmula que toma en cuenta la superficie corporal:

La fórmula para calcular el aclaramiento es:

$$UCr \text{ (mg/dl)} \times Vu \text{ (ml)} \times 1,73 / SCr \text{ (mg/dl)} \times 1440 \times S$$

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

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

Estimación usando la fórmula Cockcroft-Gault

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

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

Intervalo de referencia

En los hombres, el índice normal de depuración de creatinina es 97 a 137 mL/min. En las mujeres es de 88 a 128 mL/min

Significado clínico

Los estadios tempranos de la enfermedad renal crónica son silenciosos, y solamente pueden ser detectados por los exámenes de laboratorio. La evaluación de la enfermedad renal crónica depende del nivel actual de la función renal. La velocidad de filtración glomerular es considerada la prueba standard de oro para identificar el nivel de función renal tanto en individuos sanos como afectados.

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

- Estadio 1: normal= velocidad de filtración glomerular $> o$ igual a 90 mL/min/1.73m².
- Estadio 2: daño renal leve = 60-89 mL/min/1.73m².
- Estadio 3: daño moderado = 30-59 mL/min/1.73m²
- Estadio 4: daño severo = 15-29 mL/min/1.73m²
- Estadio 5: falla renal= < 15 mL/min/1.73m²



La velocidad de filtración glomerular es una medición directa de la capacidad de filtración glomerular; la VFG disminuye en los pacientes glomerulopáticos con aumento en la proteinuria y disminuye en los pacientes con proteinuria baja. La velocidad de filtración declina alrededor del 10% por década después de los 50 años de edad. Algunos pacientes con una significativa velocidad de filtración tienen un ligero aumento de la creatinina sérica. La depuración está calculada en base a la superficie del área del paciente. El porcentaje de error estimado en la determinación de la depuración utilizando orina de 24 horas está entre el 10-15%.

6.8.11 Creatina quinasa (CK ó CPK)

Definición

La creatina quinasa es una enzima que se encuentra normalmente en los músculos estriados en una alta concentración y muy poca se encuentra en el miocardio y en el cerebro.

Fundamento

La creatina quinasa (CK) cataliza la fosforilación el ADP por el fosfato de creatinina, obteniéndose creatina y ATP. La concentración catalítica se determina empleando las reacciones acopladas de la hexoquinasa y glucosa 6 – fosfato deshidrogenasa a partir de la velocidad de formación del NADPH

Fosfato de creatinina + ADP CK Creatina + ATP

ATP + Glucosa HEXOQUINASA ADP + Glucosa- 6-fosfato

Glucosa-6-fosfato + ADP G6F-DH Gluconato-6-fosfato + NADPH + H

Objetivo

Medir la concentración de creatinina presente en las muestras de sangre (suero) que se procesen en el servicio.

Responsabilidad

Los tecnólogos médicos de la sección correspondiente son los responsables de la realización de este procedimiento se realice bajo los estándares del laboratorio y el Jefe de servicio es el responsable del control periódico del procesamiento.

Materiales y Equipos

Muestra; suero

Recolección; obtener suero o plasma de la manera usual, separar el coágulo lo antes posible, dentro de las 02 horas contadas de la recolección.

Materiales; estos son:

- Tubos de 13 x 100 o de 16 x 150 mm.
- Pipetas automáticas de 100 ul y de 1000 ul.
- Espectrofotómetro digital o Analizador semiautomatizado.
- Reloj o timer.
- Reactivos para procesamiento de creatinfosfoquinasa.

Orientación Técnica

Reconstituir el reactivo de acuerdo a instrucciones.

Técnica Manual, Cinética



- Precalentar el reactivo de trabajo a 37°C durante unos minutos.

- Pipetear :

	Blanco
Muestra	100 u/L
Reactivo de Trabajo	1.0 mL

- Mezclar y transferir de inmediato a una cubeta e insertarla al termostatzado a 37°C.
- Calibre el cero del Espectrofotómetro a 340 nm con agua destilada.
- A los 30 minutos anotar la absorbancia inicial y efectuar nuevas lecturas cada minuto durante 3 minutos.
- Calcular el incremento de absorbancia por minuto promedio.

$$\text{Abs / min} \times 4127 = \text{U / L}$$

Técnica en Equipo Analizador Automático

Según procedimiento indicado.

Valor de Referencia

Hombres: 24 - 195 U / L

Mujeres : 24 - 170 U/ L

Interferencia e Implicancia Clínica

Interferencias

Los sueros con Hemólisis visible o intensa producen valores falsamente aumentados, por lo que no deben ser usados. La hemólisis ligera o moderada no interfiere.

Implicancia Clínica

Aumentado

Infarto de miocardio.

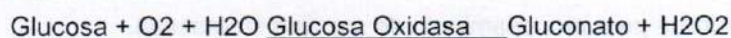
6.8.12 Glucosa (Método de la Glucosa Oxidasa)

Definición

La Glucosa debe investigarse con técnicas que dosifiquen únicamente la glucosa verdadera y evitar los sistemas que dosifiquen también otros sacaroides. Hoy en día los mejores son los enzimáticos.

Fundamento

La glucosa presente en la muestra origina, según las reacciones acopladas descritas a continuación, un complejo coloreado cuantificado por espectrofotometría.



Objetivos

Medir la concentración de Glucosa presente en las muestras de sangre (suero) que se procesen en el servicio de bioquímica.

Responsabilidad

Los tecnólogos médicos de la sección correspondiente son los responsables de la realización de este procedimiento se realice bajo los estándares del laboratorio y el Jefe de servicio es el responsable del control periódico del procesamiento.

Materiales y Equipos

Muestra; suero o plasma recolectado con anticoagulantes comunes

Recolección; obtener suero o plasma de la manera usual, separar el coágulo lo antes posible, dentro de las 02 horas contadas de la recolección.

Materiales; estos son:

- Tubos de 13 x 100 o de 12 x 75 mm.
- Pipetas automáticas de 10 ul y de 1000 ul.
- Espectrofotómetro digital o Analizador semiautomatizado.
- Reloj o timer.
- Reactivos para procesamiento de Glucosa Enzimática

Orientación Técnica, Reconstituir el reactivo de acuerdo a instrucciones.

Técnica Manual, cinética

- Pipetear en tubos de ensayo:

	Blanco	Estándar	Muestra
Estándar (100 mg/dl)	-	10 ul	-
Muestra	-	-	10 ul
Reactivo Trabajo (*)	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

(*) 4 Aminoantipirina 0.38 mmol/L + fenol 0.75 mol/L + Glucosa Oxidasa 15 U/ml + peroxidasa 1.5 U/ml + mutaratos 2 ml

- Agitar bien y dejar reposar por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Leer la observancia del estándar y de la muestra frente al blanco a 505 nm antes de 15 minutos.
- Calcular:

$$\frac{\text{Abs. Muestra} \times 100 \text{ mg/dl}}{\text{Abs. Estándar}}$$

Técnica en Equipo Analizador Automático

Seguir el procedimiento indicado



Objetivos

Medir la concentración de Glucosa presente en las muestras de sangre (suero) que se procesen en el servicio de bioquímica.

Responsabilidad

Los tecnólogos médicos de la sección correspondiente son los responsables de la realización de este procedimiento se realice bajo los estándares del laboratorio y el Jefe de servicio es el responsable del control periódico del procesamiento.

Materiales y Equipos

Muestra; suero o plasma recolectado con anticoagulantes comunes

Recolección; obtener suero o plasma de la manera usual, separar el coágulo lo antes posible, dentro de las 02 horas contadas de la recolección.

Materiales; estos son:

- Tubos de 13 x 100 o de 12 x 75 mm.
- Pipetas automáticas de 10 ul y de 1000 ul.
- Espectrofotómetro digital o Analizador semiautomatizado.
- Reloj o timer.
- Reactivos para procesamiento de Glucosa Enzimática

Orientación Técnica, Reconstituir el reactivo de acuerdo a instrucciones.

Técnica Manual, cinética

- Pipetear en tubos de ensayo:

	Blanco	Estándar	Muestra
Estándar (100 mg/dl)	-	10 ul	-
Muestra	-	-	10 ul
Reactivo Trabajo (*)	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

(*) 4 Aminoantipirina 0.38 mmol/L + fenol 0.75 mol/L + Glucosa Oxidasa 15 U/ml + peroxidasa 1.5 U/ml + mutaratos 2 ml

- Agitar bien y dejar reposar por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Leer la observancia del estándar y de la muestra frente al blanco a 505 nm antes de 15 minutos.
- Calcular:

$\text{Abs. Muestra} \times 100 \text{ mg/dl}$

Abs. Estándar

Técnica en Equipo Analizador Automático

Seguir el procedimiento indicado



- Espectrofotómetro digital o Analizador semiautomatizado.
- Reloj o timer.
- Reactivos para procesamiento de Triglicéridos.

Orientación Técnica

Reconstituir el reactivo de acuerdo a instrucciones.

Técnica Manual, del punto final

- Pipetear en tubos de ensayo:

	Blanco	Estándar	Muestra
Estándar (200mg/dl)	-	10 ul	-
Muestra	-	-	10 ul
Reactivo Trabajo (*)	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

- Agitar bien y dejar reposar por 5 minutos a temperatura 37°C.
- Leer la observancia del estándar y de la muestra frente al blanco a 546 nm antes de 15 minutos
- Calcular:

$$\frac{\text{Abs. Muestra} \times 200 \text{ mg/dl}}{\text{Abs. Estándar}}$$

Abs. Estándar

Técnica en Equipo Analizador Automático

Seguir el procedimiento indicado

Valores de Referencia

10 – 200 mg/dl

Interferencia e Implicancia Clínica

Interferencias

- Hemólisis (moderada o intensa) pueden producir valores falsamente aumentados.
- En sueros con exceso de Lipasa pancreática los triglicéridos se degradan muy rápidamente. Para evitar tal inconveniente se recomienda procesarlos a la brevedad.

Implicancia Clínica

Aumentado

Se asocia a varias patologías, tales como enfermedad hepática renal hiperlipidemias esenciales, etc. Como caso especial es el aumento de los TG en pacientes obesos, en los cuales tiene importancia pronóstica en desarrollar enfermedad cardíaca coronaria.

Disminuido

Sin mucha importancia.



6.8.14 Urea (Método Enzimático)

Definición

La Urea constituye una de los principales metabolitos del metabolismo proteico, se produce en el ciclo de la urea o ciclo de Krebs – Henseleit a nivel hepático, para ser eliminado luego por la vía urinaria.

Fundamento

Urea + H₂O UREASA 2 NH₃ + CO₂

2 Cetoglutarato + 2 NH₄ + 2 NADH Glutámico deshidrogenasa 2 + L- Glutamico + 2 NAD⁺ + 2 H₂O

Objetivo

Medir la concentración de Urea presente en las muestras de sangre (suero) que se procesen en el servicio.

Responsabilidad

Los tecnólogos médicos de la sección correspondiente son los responsables de la realización que este procedimiento se realice bajo los estándares de laboratorio y el jefe de servicio es el responsable del control periódico del procedimiento.

Materiales y Equipos

Muestra; suero u orina de 24 horas.

Recolección; obtener suero o plasma de la manera usual, separar el coagulo lo antes posible, dentro de las 02 horas contadas de la recolección.

Materiales; estos son:

- Tubos de 13 x 100 o de 12 x 75 mm
- Pipetas automáticas de 50, 100 y 1000 ul
- Espectrofotómetro digital o analizador automático
- Reloj
- Reactivo para procesamiento de Urea.

Orientación Técnica

Técnica Manual; cinética

- Precalentar el reactivo de trabajo a 37°C durante unos minutos.
- Calibre el cero del espectrofotómetro a 340 nm con agua destilada.
- Pipetear en una precalentada a 37°C

Reactivo Trabajo*	1.0 ml
Patrón**o Muestra	100 ul

- Mezclar y poner el cronometro en marcha de inmediato
- A los 30" anotar la absorbancia (A1) y luego a los 90" (A2)



- Calcular:

$$\frac{(A2 - A1) \text{ MUESTRA } \times 50}{(A2 - A1) \text{ PATRON}} = \text{mg/dL}$$

$$(A2 - A1) \text{ PATRON}$$

Técnica en Equipo Analizador Semiautomático

Seguir procedimiento indicado.

Valor de Referencia

20-40 mg/dL

Interferencia e Implicancia Clínica

Interferencias

Los anticoagulantes que contienen fluoruro inhiben la acción de la ureasa.

Los vapores amoniacales contaminan la muestra, produciendo valores falsamente elevados.

Evitar la exposición a dichos contaminantes.

Implicancia Clínica

Aumentado

La hiperazoemia puede tener:

- Origen doble
- De origen renal: nefritis agudas, nefrosis por tóxicos, obstrucciones urinarias
- De origen extra-renal. Insuficiencia cardíaca avanzada, deshidratación cloropénica, cuadros neurológicos, fiebre.

Disminuido

Nefrosis, amiloidosis y en la insuficiencia hepática aguda.

6.8.15 Fosfatasa Alcalina (ALP)

Definición

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



incrementarse hasta 10 o 15 veces más que los valores normales, pero en general sólo se observan leves elevaciones de 2 a 3 veces los valores normales en afecciones hepatocelulares como hepatitis. Además, la síntesis de esta enzima se estimula por la colestasis. Otras afecciones hepáticas que también incrementan la actividad de la fosfatasa alcalina son: la mononucleosis infecciosa, la colangiolitis, la cirrosis total, carcinoma hepatocelular primario y carcinoma hepático metastático secundario, también incrementan la actividad de la fosfatasa alcalina. La ALP también se sintetiza en las células osteoblásticas, en donde se produce la formación de hueso. Por tanto, en afecciones óseas con incremento de actividad osteoblástica, en general los niveles de fosfatasa alcalina se elevan. En algunas afecciones que incluyen hipotiroidismo, escorbuto, hipofosfatemia, Kwashiorkor (niño rojo), cratinismo y anemia grave, se observa reducción de la actividad de fosfatasa alcalina. Es muy complicada la interpretación de la medición de la fosfatasa alcalina sérica, debido a que la actividad de la enzima puede aumentar en ausencia de enfermedad hepática. También se incrementa la actividad de la fosfatasa alcalina sérica durante la pubertad debido al crecimiento acelerado de los huesos y, durante el tercer trimestre del embarazo debido a la liberación de la fosfatasa alcalina por la placenta.

Objetivos

Demostrar el manejo adecuado de la técnica para la determinación de la enzima fosfatasa alcalina ALP en una muestra biológica

Establecer los valores normales de referencia de las actividades de esta enzima y comparar con el valor de nuestra muestra problema a analizar.

Definir cuáles son las principales patologías que se presentan si tenemos valores altos o bajos de estas enzimas en una muestra biológica.

Fundamentación

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

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

Metodología

Muestra biológica

Suero, plasma heparinizado. La actividad del enzima debe ser determinada rápidamente o bien separar el suero de los hematíes. La pérdida de la actividad enzimática es menor de un 10% entre 2 a 3 días a 15- 25°C o durante 1 mes a 20°C.

Material

5 tubos de ensaye de 13 X100mm. 1 Micropipetas de 1.0 mL.



1 Micropipeta de 50mL. Puntas para micropipeta. Gradilla

4.3. Equipo

Espectrofotómetro o Fotómetro termostable a 37°C con filtro de 405 nm.
Centrifuga

6.8.16 Gammma glutamil transpeptidasa

Definición

La GGT (o γ -GT) es una enzima localizada en la membrana que juega un papel importante en el metabolismo del glutatión y en la reabsorción de los aminoácidos del filtrado glomerular y de la luz intestinal. El glutatión (γ -glutamylcysteinylglycine) en presencia de la GGT y un aminoácido o péptido transfiere el glutamato al aminoácido formando un enlace péptidico en el ácido γ -carboxílico, formando, por consiguiente, cisteinilglycine y el péptido γ -glutamyl correspondiente. Aunque la mayor actividad de la GGT se presenta en el tejido renal, la elevación de la GGT generalmente es un indicador de la enfermedad hepática. La GGT sérica se eleva antes que las otras enzimas hepáticas en enfermedades como la colecistitis aguda, la pancreatitis aguda, la necrosis hepática aguda y subaguda, y neoplasias de sitios múltiples que cursan con metástasis hepáticas. Puesto que la GGT es una enzima microsomal hepática, la ingestión crónica de alcohol o drogas como los barbitúricos, los antidepresivos tricíclicos y los anticonvulsivantes inducen la producción de enzimas microsomales. Estas elevaciones inducidas por drogas preceden cualquier otro cambio en las enzimas del hígado y si se suspende la ingestión de la droga en ese momento, los cambios del hígado son generalmente reversibles. La GGT permite la diferenciación de otras enfermedades hepáticas en las cuales por sus condiciones se eleva la fosfatasa alcalina sérica, puesto que los niveles de GGT son normales en la enfermedad de Paget, el raquitismo y la osteomalacia y en los niños y mujeres embarazadas sin enfermedad hepática. Asimismo, puesto que la próstata tiene una actividad significativa de GGT, la actividad sérica es mayor en hombres sanos que en mujeres. La mayor utilidad de la GGT está en el diagnóstico de colestasis causadas por la ingestión crónica de alcohol o drogas, colestasis mecánicas o virales, metástasis hepáticas, desórdenes óseos con elevaciones de la fosfatasa alcalina, pero en los que la GGT es normal y desórdenes de músculo esquelético en los cuales la transaminasa ASAT está elevada pero la GGT está normal.

Objetivos

Conocer la fundamentación del método.

Demostrar el manejo adecuado de la técnica para la determinación de la gama glutamiltransferasa en una muestra biológica.

Establecer los valores de referencia de la enzima GGT y comparar con el valor de nuestra muestra problema a analizar.

Definir cuáles son las principales patologías que se presentan si se presentan valores altos o bajos de GGT en una muestra biológica.

Fundamento del método

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



GGT

g-glutamyl-p-nitroanilina + glicilglicina → g-glutamyl-glicilglicina + p-nitroanilina

En el inserto ¿cuál ha sido el cambio que se ha realizado a la fundamentación?

Metodología

Material biológico

Solamente utilizar suero. No utilizar plasma. La γ -GT es estable en el suero 8 horas a 15- 25°C, 3 días a 2-8°C y un mes congelado a -20°C.

Material

5 tubos de ensaye de 13 X100mm. 1 Micropipetas de 1.0 mL.

1 Micropipeta de 200mL. Puntas para micropipeta. Gradilla

Equipo

Espectrofotómetro ó Fotómetro termostable a 37°C con filtro de 405 nm.
Centrífuga

6.8.17 Tolerancia a la Glucosa

Definición

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

Objetivo

Determinar la concentración de glucosa durante un estímulo por glucosa oral dosis única y posprandial en una muestra biológica mediante el método enzimático glucosa-oxidasa.

Fundamento

El fundamento es establecer la capacidad que tiene el organismo de un individuo para metabolizar una dosis fija de glucosa administrada por vía oral. Su objetivo es diagnosticar o descartar diabetes u otros cuadros relacionados con resistencia a la insulina. Los métodos más utilizados más comúnmente para evaluar la tolerancia a una sobrecarga de glucosa pueden ser:

- Pruebas de tolerancia utilizando una dosis única oral de glucosa.
- Pruebas de tolerancia con una dosis intravenosa de glucosa.

La prueba más común de tolerancia a la glucosa es la oral. Después de una noche de ayuno (8 a 14 horas), se toma una muestra de sangre 2 horas después de ingerir



una carga oral de 75 g de glucosa. Las mediciones intermedias no se realizan de manera rutinaria, a menos que sea solicitado por el médico. Por este motivo se eliminó el término "curva de tolerancia a la glucosa".

Además, el paciente no puede comer durante el examen y se recomienda informar al médico acerca del uso de medicamentos que pueden afectar los resultados del examen. Con frecuencia se solicita la medición de los niveles de insulina (hormona producida por el páncreas que permite introducir la glucosa desde la sangre hasta las cada una de las células del cuerpo). Cuando se suministra la glucosa por boca, la absorción desde el tracto gastrointestinal hacia la sangre continúa durante un lapso variable, que depende de la cantidad de glucosa suministrada. La máxima absorción de glucosa se estima en 0,8 g/kg de peso por hora.

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

Metodología

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

Condiciones del Paciente

- La persona come normalmente durante los 3 días que preceden la prueba; sin restricción de carbohidratos (CHO), pero integrará a uno de sus días un total de 100 gr de glucosa, lo que se consigue comiendo al final de sus comidas un pan dulce con mantequilla y abundante mermelada o cajeta.
- La persona no come ni toma nada (excepto el agua en razonables cantidades) durante las 8 – 12 horas antes de la prueba.
- La persona debe descansar (no estar activa) durante las 2 horas de la prueba.
- La persona no debe fumar durante las horas de ayunas ni durante las 2 horas de la prueba.
- Otros factores pueden distorsionar el poder diagnóstico de la prueba y deben evitarse: inactividad física severa en las semanas anteriores a la prueba, estar obligado a estar en cama durante varios días anteriores a la prueba, estrés médico (enfermedad) o quirúrgico, algunas drogas (tiazidas, β -bloqueadores, glucocorticoides, fenitoína).

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

- La Prueba de tolerancia oral a la glucosa debe administrarse en las horas matutinas (antes de las 12 horas).
- Se toma una muestra de sangre, en ayunas.
- La persona tiene que tomar vía oral toda la glucosa anhidra (300-350 ml) en un período de menos de 5 minutos.
- Dos horas después de iniciar la ingesta de la glucosa anhidra, se toma la segunda muestra de sangre. El resultado de glucosa sanguínea de esta segunda muestra se utiliza para el diagnóstico de la DM.

El método recomendado para la determinación es glucosa-oxidasa.



Algunos estudios utilizan pruebas iniciales a -10 minutos (en ayunas, 10 minutos antes de tomar la glucosa anhidra) y a 0 minutos (al momento en que la persona empieza a tomar la glucosa anhidra). En otros estudios, realizan 7 medidas de la glucosa sanguínea en 2 horas, u 11 medidas de la glucosa sanguínea en 5 horas, o hasta 21 medidas de la glucosa sanguínea en 7 horas. El procedimiento estándar es de 1 medición (a dos horas de haber empezado a tomar la glucosa anhidra líquida) o de 2 mediciones (en ayunas y a dos horas después de haber empezado a tomar la glucosa anhidra líquida). Así, no es obligatorio hacer las 2 mediciones, pero el primero (en ayunas) puede ser útil para determinar la presencia de hiperglucemia. En cuanto a los riesgos y los síntomas que pueda presentar una persona si le administra una carga de glucosa oral sin conocer su valor de glucemia previa a la prueba, serán pocos. El riesgo principal sería de elevar aún más la glucosa sanguínea que ya está anormalmente alta. Cada gramo de glucosa sube la glucosa sanguínea aproximadamente 5 mg/dL. Así, los 75 gramos de glucosa anhidra podrían adicionar 375 mg/dL de glucosa sanguínea al valor inicial (suponiendo la ausencia de insulina suficiente). Por eso, esta prueba está contraindicada para personas que clara u obviamente tienen DM.

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

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

Intervalos de Referencia

Después de dos horas de haber tomado la dosis de glucosa los resultados siguientes nos indican el diagnóstico:

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

Los criterios utilizados para definir la condición de anormalidad de una curva de tolerancia, se basan en el nivel o pico elevado alcanzado por la concentración sanguínea y la falta de retorno al nivel normal, 2 horas después de la ingestión de glucosa, siendo este último el más importante. Un valor hipoglucémico (bajo de glicemia) de 3 a 5 horas después de la ingestión de la glucosa se observa en ciertos pacientes cuya curva de tolerancia era de tipo diabético, interpretándose un hiperinsulinismo, típico del estado diabético. En personas con tolerancia normal a la glucosa, la glucemia no suele sobrepasar los 7,8 mmol/l (140 mg/dl) como respuesta a las comidas y, por lo general, regresa a los niveles previos a las dos o tres



horas.(26;27) La Organización Mundial de la Salud define como tolerancia normal a la glucosa tener $<7,8$ mmol/l (140 mg/dl) a las dos horas de ingerir una carga de glucosa de 75 g dentro del contexto de una prueba oral de tolerancia a la glucosa.(28) En esta guía, se define como hiperglucemia posprandial un nivel de glucosa en plasma $>7,8$ mmol/l (140 mg/dl) a las dos horas de ingerir alimentos.

6.8.18 Proteínas Totales

Definición

Las proteínas son los principales sólidos disueltos en el plasma sanguíneo. Para la síntesis de las proteínas séricas se requiere un hígado sano en plenas funciones, excepto en el caso de las gamma globulinas. El hígado tiene la capacidad de duplicar la producción y salida de proteínas durante las enfermedades asociadas con pérdida de proteínas. En consecuencia, no debe sorprender que las mediciones de proteínas totales no se alteren sino hasta que haya ocurrido una disminución extensiva de la función hepática. La proteína total del suero se compone de por lo menos varios cientos de proteínas individuales, algunas en cantidades muy pequeñas y otras como la albúmina y la inmunoglobulina G (IgG) en cantidades mayores. La concentración de proteína total es útil como un indicador aproximado de la nutrición, de la función gastrointestinal, como indicador de la viscosidad del plasma, y es la base para la cuantificación de las fracciones obtenidas por electroforesis. Una exagerada deficiencia de proteínas en la dieta y ciertas condiciones patológicas que involucran a la absorción intestinal, dan como resultado una baja concentración de proteínas séricas lo que se denomina hipoproteinemia. La hiperproteinemia se define en términos de proteínas séricas totales de más de 9.0 g/dl, y puede deberse casi exclusivamente a hipergammaglobulinemia. Las proteínas totales se dividen en: albúmina y globulinas. Las globulinas son un grupo muy grande de proteínas que se subclasifican en alfa, beta y gamma globulinas. Cuando se les separa por electroforesis (defina electroforesis) se observan cinco fracciones: la más anódica es la prealbúmina y la albúmina, luego la alfa 1, alfa 2, beta y gamma, siendo éstas últimas las más catódicas.

Si además queremos separar inmunoglobulinas podemos hacer una inmunolectroforesis (defina inmunolectroforesis), teniendo como resultado la separación de las cinco fracciones de las gamma globulinas, que son: la G, A, M, E y D. dibuje a continuación una inmunolectroforesis de la fracción gamma de las proteínas séricas. Además si se requiere identificar a una globulina en particular existen metodologías para realizarlo. Por ejemplo, se cuantifica la transferrina, todas las proteínas de la coagulación, las gammaglobulinas, la transcobalamina, la hemopexina, haptoglobina, etc.

Objetivo

- Determinación de Proteínas totales muestra problema a analizar.
- Definir cuáles son las principales patologías que se presentan si tenemos valores altos o bajos de proteínas.

Fundamento del Método

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

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

Kjeldhal.

Metodología

Material Biológico

Suero o plasma de un paciente con 8 horas de ayuno, o en fase postabortiva (ayuno)
Conservación de la muestra: si el suero se separa rápidamente y se conserva en congelación, se conserva bien siempre y cuando no se repita la operación varias veces porque pueden sufrir desnaturalizaciones. Si se conservan en refrigeración los tubos deberán estar bien tapados para evitar la evaporación, se puede emplear plasma usando heparina.

6.9 Rutinas

Estas se clasifican en dos:

• Rutinas del Servicio

- Recepción y proceso de muestras de sangre de pacientes ambulatorios y/o hospitalizados.
- Recepción y proceso de muestras de orina simple y de 24 horas de pacientes.
- Recepción y proceso de muestras de líquidos corporales en pacientes ambulatorios y/o hospitalizados.

• Urgentes del Servicio

- Recepción y proceso de muestras de sangre y orina en pacientes hospitalizados.

6.10 Lineamientos

- Es responsabilidad de todo el personal que labora en el Laboratorio de Análisis Clínicos cumplir con estos lineamientos.
- El trabajador utilizará el equipo de protección personal durante sus actividades en el laboratorio.
- Es responsabilidad y obligación del personal cumplir las normas del laboratorio en cuanto a: seguridad, limpieza, orden, manejo de equipo y manejo de residuos biológicos.

VII. RESPONSABILIDADES

El jefe de la Unidad debe revisar y vigilar el cumplimiento de estos procedimientos, y el personal de laboratorio tiene que aplicar y cumplir el presente manual para la Unidad de Laboratorio Clínico.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Instituto Nacional de Salud. (2005). Manual de bioseguridad en laboratorios de ensayo, biomédicos y clínicos. 3a. ed. Lima, Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 108p. (Serie de Normas Técnicas; 18).
- ISO 15189:2003. Medical laboratories. Particular requirements for quality and competence. ISO 2003.
- Norma UNE-EN ISO 15189:2012, Laboratorios Clínicos, Requisitos Particulares para la Calidad y Competencia, Madrid, AENOR, Depósito Legal: 17477: 2013.

