

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES  
Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales

# **GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS**

## ***Cátedra de Análisis Clínicos IIc***

*Prof. Adj. a /c*  
Bqca. Esp. Tibolla, María  
*J.T.P.*  
Bqca. Esp. Márquez, Nora  
Bqca. Esp. Guastavino, Marcela  
Mgter. Zacharzewski, Carolina  
*Colaborador*  
Errasti, Álvaro

EDITORIAL UNIVERSITARIA DE MISIONES  
2006



EDITORIAL UNIVERSITARIA DE MISIONES

**San Luis 1870**

Posadas - Misiones – Tel-Fax: (03752) 428601

Correos electrónicos:

edunam-admini@arnet.com.ar

edunam-direccion@arnet.com.ar

edunam-produccion@arnet.com.ar

edunam-ventas@arnet.com.ar

**Colección:** Cuadernos de Cátedra

**Armado de interiores:** Sebastián Franco

**Corrección:** Hedda Giraudó y Sebastián Franco

Guía de trabajos prácticos : cátedra de análisis clínicos IIc / coordinado por  
María Marinela Tibolla - 1a ed. - Posadas : EdUNaM - Editorial  
Universitaria de la Universidad Nacional de Misiones, 2006.  
v. 1, 60 p. ; 29x21 cm.

ISBN 950-579-055-4

1. Análisis Clínicos-Trabajos Prácticos. I. Tibolla, María Marinela, coord.  
CDD 612.015

Fecha de catalogación: 09/06/2006

ISBN-10: 950-579-055-4

ISBN-13: 978-950-579-055-5

Impreso en Argentina  
©Editorial Universitaria  
Universidad Nacional de Misiones  
Posadas, 2006

## ÍNDICE

T.P. Nº 1:	PARTE I: ORINA COMPLETA.....	9
	PARTE II: HEMATURIA.....	14
T.P. Nº 2:	DETERMINACIÓN PRECOZ DE FENILALANINA.....	16
T.P. Nº 3:	LITIASIS.....	19
T.P. Nº 4 :	PROTEINURIA - UROPROTEINOGRAMA.....	23
T.P. Nº 5:	ESTUDIO DEL FUNCIONAMIENTO RENAL: D.C.E.....	26
T.P. Nº 6:	LCR / LÍQUIDOS DE PUNCIÓN/ LÍQUIDO SINOVIAL.....	28
T.P. Nº 7:	ESPERMOGRAMA.....	33
T.P. Nº 8:	GONADOTROFINA CORIONICA HUMANA.....	38
T.P. Nº 9:	DETERMINACIÓN PRECOZ DE LA HORMONA ESTIMULANTE DE TIROIDES (TSH) NEONATAL.....	43
T.P. Nº10:	EX. QUÍMICO FUNCIONAL DE LAS HECES.....	45
T.P. Nº11:	SÍNDROMES DE MALABSORCIÓN.....	49
	Prueba de Van de Kamer	
	Clearence de $\alpha_1$ antitripsina	
T.P. Nº12:	FIBROSIS QUÍSTICA.....	52
	Determinación de Tripsina Inmunorreactiva (TIR) en Screening Neonatal	
	Test del Sudor	

## LOS AUTORES

### **TIBOLLA, María Marinela**

Bioquímica. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales – 1986  
Laboratorista Químico Industrial. F.C.E.Q.N. – 1987  
Especialista en Química – Clínica. F.C.E.Q.N. – 2000  
Profesor Adjunto a/c – Cátedra de Análisis Clínicos Ilc., Depto. Bioquímica - Clínica. F.C.E.Q.N. (03/03/03 y continúa).  
Vice-Directora del Depto. de Bioquímica – Clínica. F.C.E.Q.N. (Desde 31/03/2004 hasta 31/12/2006).  
Investigadora Categoría III. Proyecto: “Método Secuencial para Detección Temprana de Fibrosis Quística en la ciudad de Posadas” – Director Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico. F.C.E.Q.N. (Desde 01/01/2004 hasta 31/12/2006)  
Diversos trabajos presentados en Congresos y publicaciones en revistas especializadas.

### **MÁRQUEZ, Nora**

Bioquímica. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales – 1986  
Laboratorista Químico Industrial. F.C.E.Q.N. – 1987  
Especialista en Química – Clínica. F.C.E.Q.N. – 2000  
Jefe de Trabajos Prácticos – Cátedra de Análisis Clínicos Ilc., Depto. Bioquímica - Clínica. F.C.E.Q.N. (Desde 12/06/1990 y continúa).  
Investigadora Categoría III. Proyecto: “Método Secuencial para Detección Temprana de Fibrosis Quística en la ciudad de Posadas” – Director Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico. F.C.E.Q.N. (Desde 01/01/2004 hasta 31/12/2006).  
Diversos trabajos presentados en Congresos y publicaciones en revistas especializadas.

### **GUASTAVINO, Marcela Alejandra**

Bioquímica. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales – 1989  
Especialista en Química – Clínica. F.C.E.Q.N. – 2000  
Jefe de Trabajos Prácticos. Dedicación Semiexclusiva – Cátedra de Análisis Clínicos Ilc., Depto. Bioquímica - Clínica. F.C.E.Q.N. (Desde 24/04/2002 y continúa).  
Docente responsable de la Formación de Residentes Bioquímicos de la Provincia de Misiones, en el Área Gastroenterológica. F.C.E.Q.N. (Desde 1994 y continúa).  
Investigadora Categoría II. Directora del Proyecto: “Estudio de las mutaciones DF508 y G542X en pacientes pediátricos sintomáticos con valores de Test del Sudor patológicos y ‘borderline’”. (Desde 01/01/2004 hasta 31/12/2006)  
Diversos trabajos presentados en Congresos y publicaciones en revistas especializadas.

### **ZACHARZEWSKI, Carolina Leslia**

Bioquímica. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales – 1989  
Magister en Bioestadística. Universidad de Chile. Facultad de Medicina. Escuela de Salud Pública. – 1998  
Jefe de Trabajos Prácticos. Dedicación Exclusiva – Cátedra de Análisis Clínicos Ilc. Depto. Bioquímica - Clínica. F.C.E.Q.N. (Desde 04/2002 y continúa).  
Docente co-responsable de la Formación de Residentes Bioquímicos de la Provincia de Misiones, en el Área Gastroenterológica. F.C.E.Q.N. (Desde 1994 y continúa).  
Investigadora Categoría II. Directora del Proyecto: “Estudio de las mutaciones DF508 y G542X en pacientes pediátricos sintomáticos con valores de Test del Sudor patológicos y ‘borderline’”. (Desde 01/01/2004 hasta 31/12/2006)  
Diversos trabajos presentados en Congresos y publicaciones en revistas especializadas.

### **ERRASTI, Álvaro**

Estudiante avanzado de la Carrera de Bioquímica, 6º año. F.C.E.Q.N.  
Becario de Investigación en el Proyecto “Método Secuencial para Detección Temprana de Fibrosis Quística en la ciudad de Posadas”. (Desde 01/01/2004 hasta 31/12/2006)  
Trabajos presentados en Congresos.



## PROGRAMA DE ANÁLISIS CLÍNICOS IIc. - Año 2006

### MÓDULO I: ORINA - FUNCIONALISMO RENAL

#### ◆ BOLILLA I

ORINA: formación de la orina. Composición en estado normal y patológico. Recolección de la muestra. Examen físico. Valores normales y patológicos. Examen químico. Valores normales y patológicos. Sustancias interferentes. Trastornos del metabolismo de aminoácidos e hidratos de carbono.

#### ◆ BOLILLA II

ORINA: examen cualitativo del sedimento urinario. Sedimento organizado: células, leucocitos, hematíes y cilindros. Sedimento no organizado en orinas ácidas y alcalinas. Cristales del metabolismo. Elementos agregados. Hematuria: glóbulos rojos dismórficos. Control de calidad.

#### ◆ BOLILLA III

BIOQUÍMICA CLÍNICA DE LAS AFECCIONES RENALES.  
Litiasis renal, salival, biliar y fecal: marcha analítica. Análisis complementarios.  
Proteinuria: clasificación. Algoritmo del estudio de las proteinurias. Clearance proteico.

#### ◆ BOLILLA IV

PRUEBAS FUNCIONALES RENALES. Prueba de depuración plasmática: glomerular, renal, tubular. Coeficiente de filtración. Otras pruebas.  
Depuración renal con radioisótopos. Centellograma.  
Laboratorio de la insuficiencia renal aguda y crónica. Acidosis tubular.

### MÓDULO II: ELECTROLITOS Y ÁCIDO-BASE

#### ◆ BOLILLA V

EQUILIBRIO HIDROELECTROLÍTICO. Generalidades del contenido hidro-electrolítico. Homeostasis del sodio. Distribución y balance. Regulación de la excreción. Alteración del sodio sérico.  
Homeostasis del potasio. Distribución y balance. Regulación de la excreción. Alteraciones del potasio sérico.  
Cloro: Generalidades. Alteración del cloro sérico.- Bicarbonato: generalidades.  
Regulación hidroelectrolítico en la falla renal.

#### ◆ BOLILLA VI

EQUILIBRIO ÁCIDO-BASE. Principios generales. Ácidos y bases. Sistemas amortiguadores. Ventilación. Regulación del equilibrio ácido - base. Regulación respiratoria y renal.  
Afecciones del equilibrio ácido - base. Brecha de aniones.  
Obtención y manejo de muestra.

### **MÓDULO III: LÍQUIDOS SEROSOS Y OTROS LÍQUIDOS BIOLÓGICOS**

#### ◆ BOLILLA VII

LÍQUIDOS BIOLÓGICOS EXTRAVASCULARES. Líquidos serosos. Marcadores de órganos. Marcadores tumorales.

Líquido sinovial: Obtención. Examen físico - químico. Alteraciones en estado patológico.

Líquido amniótico: Consideraciones generales. Estudios químicos y genéticos. Pruebas del segundo y tercer trimestre. Esquema escalonado de decisión.

#### ◆ BOLILLA VIII

LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO. Generalidades. Examen físico y citológico. Examen químico. Perfiles electroforéticos. Enzimas. Serología. Criterios de normalidad. Cuadros patológicos.

### **MÓDULO IV: EVALUACIÓN DE LA REPRODUCCIÓN**

#### ◆ BOLILLA IX

ESTUDIO DEL LÍQUIDO ESPERMÁTICO. Espermograma. Morfología. Recolección de la muestra. Examen microscópico. Recuento celular. Fórmula espermática.

Determinaciones químicas: evaluación de glándulas accesorias.

Inmunología en Infertilidad.

#### ◆ BOLILLA X

ESTUDIO DE LA PAREJA ESTÉRIL. Estudio de los distintos factores: factor masculino, factor endócrino, factor cervical, factor inmunológico.

Nociones sobre Reproducción asistida: diferentes técnicas.

### **MÓDULO V: ENDOCRINOLOGÍA**

#### ◆ BOLILLA XI

FUNCIÓN ENDOCRINA HIPOFISIARIA. Endocrinología: generalidades. Clasificación de las glándulas endócrinas. Regulación de la secreción hormonal.

Hormonas de la Adenohipófisis: GH; ACTH; TSH; LH; LTH; MSH. Métodos de investigación. Pruebas dinámicas.

Hormonas de la Neurohipófisis. Vasopresina y Ocitocina. Métodos de investigación.

#### ◆ BOLILLA XII

TIROIDES. Síntesis de hormonas Tiroideas. Liberación hormonal. Pruebas in vitro. Pruebas complementarias para casos especiales. Estudio de los trastornos inmunológicos. Acción de las hormonas tiroideas.

Enfermedades de la glándula tiroideas.

PARATIROIDES: síntesis y liberación hormonal. Enfermedades de la glándula paratiroides.

Metabolismo fosfocálcico – magnésico.

#### ◆ BOLILLA XIII

FUNCIÓN ENDOCRINA SUPRARRENAL. Hormonas de la corteza suprarrenal. Biosíntesis de las hormonas esteroideas. Mineralocorticoides. Glucocorticoides. Esteroides.

Hormonas de la médula suprarrenal. Catecolaminas.

Métodos de investigación.

◆ BOLILLA XIV

FUNCIÓN ENDOCRINA GONADAL. Biosíntesis de hormonas esteroideas en el ovario. Regulación de la función ovárica. Trastornos del ciclo.

Pico ovulatorio: Moco cervical. Urocitograma y colpocitograma hormonal. Temperatura basal.

Determinación de Estríol y Progesterona. Amenorrea.

Determinación de Testosterona.

Determinación de Gonadotrofina coriónica humana.

## **MÓDULO VI: FUNCIONALISMO DIGESTIVO**

◆ BOLILLA XV

PRUEBAS BIOQUÍMICAS EN GASTROENTEROLOGÍA

Contenido Gástrico – Duodenal: Estudio fisiológico. Secreción y estimulación.

Péptidos reguladores del intestino: Gastrina; Colecistocinina; Secretina; Somatostatina, Bombesina y Péptido liberador de gastrina. Técnicas e interpretación. Patologías asociadas.

Secreción entérica: Pepsinógeno. Actividad enzimática. Alteraciones. Interpretación bioquímica.

◆ BOLILLA XVI

DIAGNÓSTICO BIOQUÍMICA DEL SÍNDROME DE MALA ABSORCIÓN INTESTINAL.

Estudio Químico y Funcional de las Heces. Caracteres físico - químico. Productos residuales de secreción y excreción. Elementos patológicos. Pruebas específicas. Alteraciones en el tránsito intestinal.

Estudio de la digestibilidad. Recolección del material. Examen macro y microscópico.

Enfermedad asociadas a Síndromes de Malabsorción: Diarreas; Enfermedad celíaca; Fibrosis quística Valoración. Indicadores.



**TRABAJO PRACTICO N° 1**  
**PARTE I: ORINA COMPLETA**  
**EXAMEN FÍSICO - QUÍMICO – SEDIMENTO MICROSCÓPICO**

---

### **INTRODUCCIÓN**

El análisis de orina completa comprende un examen de las características fisicoquímicas, donde el término “*screening*” implica que un resultado positivo debe ser seguido con estudios más amplios, como así también de la observación del examen microscópico del sedimento.

Cabe recordar que la formación de orina comprende los complejos procesos de filtración de la sangre, reabsorción de sustancias esenciales, incluyendo el agua, y secreción tubular de ciertas sustancias. De los aproximadamente 120 ml/min de líquido filtrado por el glomérulo, solo un promedio de 1 ml/min es excretado finalmente en la forma de orina (volumen diario promedio normal de orina para un adulto: 1200-1500 ml/24 Hs).

Los principales constituyentes de la orina son: agua, urea, ac. úrico, creatinina, sodio, potasio, cloro, etc.; apareciendo en algunos procesos patológicos sustancias tales como: cuerpos cetónicos, proteínas, glucosa, porfirinas y bilirrubina. La orina también puede contener estructuras como cilindros, cristales, células sanguíneas y epiteliales. La presencia de estos elementos en mayor o menor grado determinarán la existencia o no de patologías asociadas al árbol renal.

La realización de un análisis de orina completa comienza con una adecuada técnica de recolección del material biológico (ver 1. Muestra).

### **OBJETIVOS**

- Reconocer la presencia de elementos normales y patológicos en muestras de orina provenientes de pacientes ambulatorios y hospitalizados.
- Adquirir destreza y practicidad en el manipuleo de la muestra de orina.
- Formar criterio clínico para informar los hallazgos bioquímicos mediante la interrelación de los conocimientos adquiridos.
- Formar criterio clínico para informar los hallazgos bioquímicos mediante la interrelación de los distintos parámetros analizados en una muestra de orina completa.

### **1.- MUESTRA**

Orina de reciente micción, de preferencia la primera orina de la mañana, concentrada, previa higiene (según sexo).

### **2.- EXAMEN FÍSICO:**

**a) Aspecto:** límpido, ligeramente turbio, o turbio.

**b) Color:** amarillo pálido, amarillo, amarillo ámbar, anaranjado, rojizo, etc.

**c) Olor:** sui generis, amoniacal, pútrido, a frutas, etc.

**d) Espuma:** blanca y fugaz, blanca y persistente, amarilla y persistente.

**e) Densidad:**

Técnica. Colocar la orina en una probeta adecuada, introducir el urodensímetro e imprimir un ligero movimiento de rotación, leer la parte inferior del menisco que forma la orina en la escala del densímetro.

Corrección. Se deben efectuar las correspondientes correcciones de temperatura, concentración de glucosa y proteínas.

- El densímetro está calibrado a 15 °C , si en el momento de la determinación la temperatura no fuera esta, se corrige sumando o restando según sea la temp. superior o inferior a la calibrada:

- 0,001 por cada 3°C de diferencia.
- 1 gr. de glucosa aumenta la densidad en 0,0004.
- 1 gr. de proteínas aumenta la densidad en 0,00003.

los valores de densidad pueden variar normalmente entre 1,000 – 1,030

### VALORES DE REFERENCIA

	<b>DENSIDAD</b>
<b>RN pretérmino</b>	1003 - 1005
<b>RN término</b>	1005 - 1010
<b>Lactantes</b>	1010 – 1020
<b>Adultos</b>	> 1025

### Uso de tira reactiva

Este análisis está basado en el cambio del pKa de ciertos polielectrolitos pretratados en relación con la concentración iónica. En presencia de un indicador los colores varían desde un azul verdoso en orinas de baja concentración iónica, pasando por verde, hasta amarillo verdoso en orinas de alta concentración iónica.

**f) Reacción de pH:** las orinas deben ser recién emitidas.

Técnica. Sumergir la tira en la muestra de orina y comparar con la escala de colores. Varía entre 4 - 8.

**g) Sedimento macroscópico:** escaso, regular o abundante.

## **3. EXAMEN QUÍMICO**

### **a) Proteínas**

Uso de tiras reactivas: poseen un indicador de pH con buffer. El citrato que actúa como tampón mantiene el pH en 3, frente al Azul de tetrabromofenol, le da a la zona impregnada un color amarillo, en presencia de concentraciones diferentes de proteínas virará del amarillo-verde, verde, llegando al azul.

### **b) Glúcidos**

Uso de tiras reactivas: la tira se basa en el método de la glucosa - oxidasa - peroxidasa. La misma contiene un área amarilla de prueba, impregnada en reactivo, que cuando se moja con orina que contiene glucosa se vuelve verde. Reacciona con muestras con glucosa a concentraciones mayores o iguales a 0,1%. Los colores se comparan con patrones.

Falso negativos: grandes cantidades de ac. ascórbico.

### **c) Cuerpos cetónicos**

Uso de tiras reactivas: la tira contiene un área impregnada con react. ac. amino-acético, nitroprusiato de sodio, fosfato y borato de sodio, lactosa. Introducir la tira en la orina bien homogeneizada y después de 15 seg. comparar el color con la carta de colores.

La tira no reacciona con el ac. beta-hidroxibutírico ni con la acetona.

#### d) Urobilinógeno

Uso de tiras reactivas: se basa en la reacción de una sal de diazonio estable con el urobilinógeno en medio ácido, originando un colorante rojo azoico.

#### e) Hemoglobina

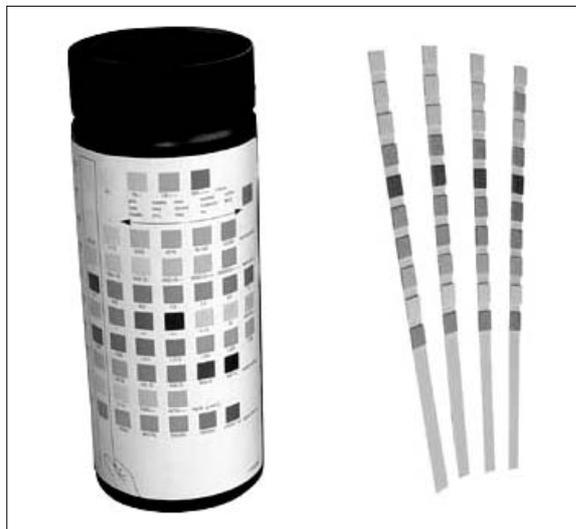
Uso de tiras reactivas: se basa en la actividad pseudoperoxidásica de la hemoglobina de la mioglobina que catalizan la oxidación del indicador cromático mediante un hidroperóxido orgánico generando un colorante azul-verdoso que, sobre el sector reactivo amarillo produce un viraje cromático, hacia el verde.

Si la presencia de sangre se debiera a hematíes intactos, la visualización sería en forma de manchas o puntuado fino.

Falsos positivos: bacterias con actividad peroxidásica y sustancias tales como el hipoclorito de sodio.

#### f) Bilirrubina

Uso de tiras reactivas: se basa en la copulación de la bilirrubina con una sal de diazonio estable en medio ácido, dando un colorante azoico rosa -violáceo.



### TÉCNICAS ALTERNATIVAS

- **Proteínas:** puede determinarse por diversos métodos

- Por calentamiento: colocar en un tubo unas gotas de orina, agregar unas gotas de ac. acético al 10%. Calentar la parte superior del tubo, se deberá producir enturbiamiento en esa zona.
- Reacción de ac. Sulfosalicílico: trabajar con unas gotas de orina y agregar unas gotas de ac. sulfosalicílico al 3%. Mezclar y dejar en reposo 5 min. Si la reacción es positiva aparece turbiedad.
- Reacción del ac. Tricloroacético: colocar unas gotas de orina en un tubo y agregar gotas de ac. tricloroacético al 20%. Calentar a ebullición, y la aparición de turbiedad indica la presencia de proteínas.

- **Glúcidos**

Método de Fehling

**Sn. A:** Sulfato de cobre.....3,5 gr.  
Ac. sulfúrico conc.....0,5 ml.  
agua dest.....100 ml.

**Sn. B:** Tartrato de Na y K .....15 gr.  
NAOH al 40%.....30 ml.  
agua dest.....100 ml.

Para usar, mezclar partes iguales de las Sn. A y B., y agregar igual cantidad de orina en un tubo de ensayo. Calentar a ebullición. Si la orina contiene glucosa se reducirá la sal de cobre, formando un precipitado de color rojo o rojo – amarillento (color ladrillo).

**- Hemoglobina**

Reacción de la bencidina

*Reactivo:* preparar en el momento de hacer la reacción. Una Sn. saturada de bencidina en ac. acético (0,1 gr de bencidina y 10 ml. de ac. acético), agregar igual volumen de agua oxigenada de 30 vol. En un tubo de ensayo agregar unas gotas de orina y unas gotas de reactivo de bencidina y agua oxigenada. De existir sangre aparecerá una coloración azul-verdosa.

Evitar el agregado de exceso de agua oxigenada, debido a que si existiera poca hemoglobina podría destruirse por oxidación, no apareciendo la reacción.

**3.- EXAMEN MICROSCÓPICO**

**Técnica: Estandarización del sedimento urinario**

Para comparar dos o más resultados de una misma orina y de un mismo paciente, se debe realizar en condiciones similares de:

- volúmenes iguales por tubo (aprox. 10 ml.);
- volúmenes iguales retenidos después de la centrifugación (aprox. 0,5-1 ml.);
- número de revoluciones de centrifugado, muestra y tiempo iguales (2000 rpm. x 5 min);
- observación con un mismo aumento (400 X);
- tiempo de recolección de la orina (primera de la mañana).

**Observación microscópica**

Sedimento organizado

- Células epiteliales: planas, redondas (escaso, regular o abundantes).

- Leucocitos :           escaso. :           mujer 5xc . ---- hombre. 3 x c.  
                                   regular:           5 -- 10 x c.  
                                   abund. :           más de 10 x c.

- Hematíes :            escaso. :           1 -- 3 x c.  
                                   regular:           4 -- 10 xc.  
                                   abund.:            más de 10 xc.

- Cilindros:            Tipo.  
                                   Cantidad: escasos; regular o abundantes.

Sedimento no organizado

- <b>Cristales de Orinas ácidas</b>	{	Uratos amorfos (Ca, Mg, K) Uratos de sodio, amonio. Ác. úrico Oxalato de Ca Biurato de amonio	}	<u>Cristales</u> <u>metabólicos</u>	{	Cistina Leucina Tirosina Colesterol
-------------------------------------	---	---	---	--	---	--

**Cristales de Orinas alcalinas** { Fosfatos amorfos  
Fosfatos de calcio, magnesio y amonio  
Carbonato de calcio  
Sulfato de calcio

**Otros elementos** { Bacterias  
Parásitos { Tricomonas vaginalis  
Quistes de Giardia  
Oxiurus  
Hongos  
Espermatozoides

**Artefactos** { Cristales de contraste radiográficos  
Cristales de almidón.  
Fibras.

**MODELO DE INFORME: ANÁLISIS DE ORINA COMPLETA**

<b>Nombre del paciente:</b> .....	<b>Fecha:</b> ../../..
<b>EXAMEN FÍSICO:</b> Color: Aspecto: Olor: Sed. Macroscópico: Espuma: Densidad: Reacción pH:	<b>- EXAMEN QUÍMICO :</b> Proteínas: Glucosa: Cuerpos cetónicos: Urobilinógeno: Bilirrubina: Hemoglobina:
<b>- EXAMEN DEL SEDIMENTO MICROSCÓPICO:</b>	
	..... Firma

## PARTE II: HEMATURIA

### INTRODUCCIÓN

La morfología de los glóbulos rojos urinarios es de gran importancia para determinar el origen de la hematuria, sea glomerular o no glomerular, dado que la presencia de eritrocitos dismórficos en el sedimento urinario es indicativo de hematuria glomerular, fundamentalmente frente a la microhematuria asintomática aislada. La morfología de estos glóbulos rojos depende de varios factores a considerar:

- Fuerza deformante que actúa sobre el glóbulo rojo.
- Grado de deformabilidad del glóbulo rojo.
- Tamaño de los poros (*gaps*) de la membrana basal glomerular.
- Espesor de la membrana basal glomerular.

### Detección de eritrocitos dismórficos

El procedimiento de elección para establecer el origen de la hematuria es la microscopía de contraste de fase, utilizando para ello una muestra de orina fresca.

La muestra ideal es la que corresponde al chorro medio de la primera orina de la mañana, y debe ser procesada en un plazo máximo de 60 minutos después de emitida. También puede realizarse en una muestra de orina con 3hs. de retención y, preferentemente, luego de actividad física.

Se centrifugan 10ml de orina durante 5 minutos a 2.000 rpm, se separan 9,5 ml del sobrenadante. Se resuspenden los 0,5 ml del culote y se coloca una gota entre porta y cubre y se investiga el porcentaje y la morfología de los glóbulos rojos por microscopía de contraste de fase. Es importante remarcar que para obtener un resultado confiable se debe observar el mayor número posible de eritrocitos, y establecer así el porcentaje de los mismos.

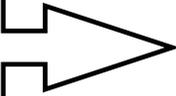
Se informa el resultado de la siguiente forma:

### Morfología de los glóbulos rojos urinarios por contraste de fase

GR eumórficos: %

GR dismórficos: % {  
% Espiculados  
% No espiculados  
% Acantocitos

### VALORES DE REFERENCIA:

<b>GR dismórficos &gt; 70 - 80%</b>		<b>Sugieren origen glomerular de la hematuria.</b>
<b>Acantocitos &gt; 4 - 5 %</b>		

## ALGORITMO DIAGNÓSTICO DE LA HEMATURIA

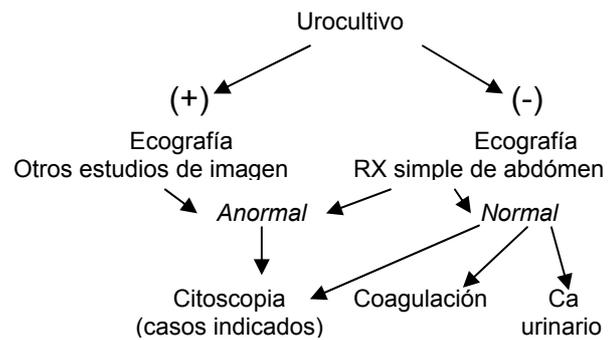
### HEMATURIA

Anamnesis y examen físico  
Citología de la orina (morfología de bemañas, cilindros, leucocitos)  
Detección de proteinuria. Urea y creatinina. Urocultivo

#### **Hematuria glomerular**

Proteinograma  
Inmunoglobulinas plasmáticas  
Complemento C3 y C4  
ANA/Hbs Ag  
Biopsia renal (casos indicados)

#### **Hematuria no glomerular**



### **BIBLIOGRAFÍA**

GRAFF, LAURINE. "Análisis de Orina. Atlas color." Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 1983.

VALLO A, RODRIGUEZ-SORIANO J. Hematuria y proteinuria en la edad pediátrica: enfoque diagnóstico. An Esp Pediatr 1988; 29 (Suppl 32): 123-9

DENNER, Susana. "Análisis de Orina – Atlas de Sedimento Urinario" Editado por la Universidad Nacional del Litoral. Argentina. 1996.-

COMITÉ NACIONAL DE NEFROLOGÍA PEDIÁTRICA. "Nefrología Pediátrica". Sociedad Argentina de Pediatría. Buenos Aires 2003.

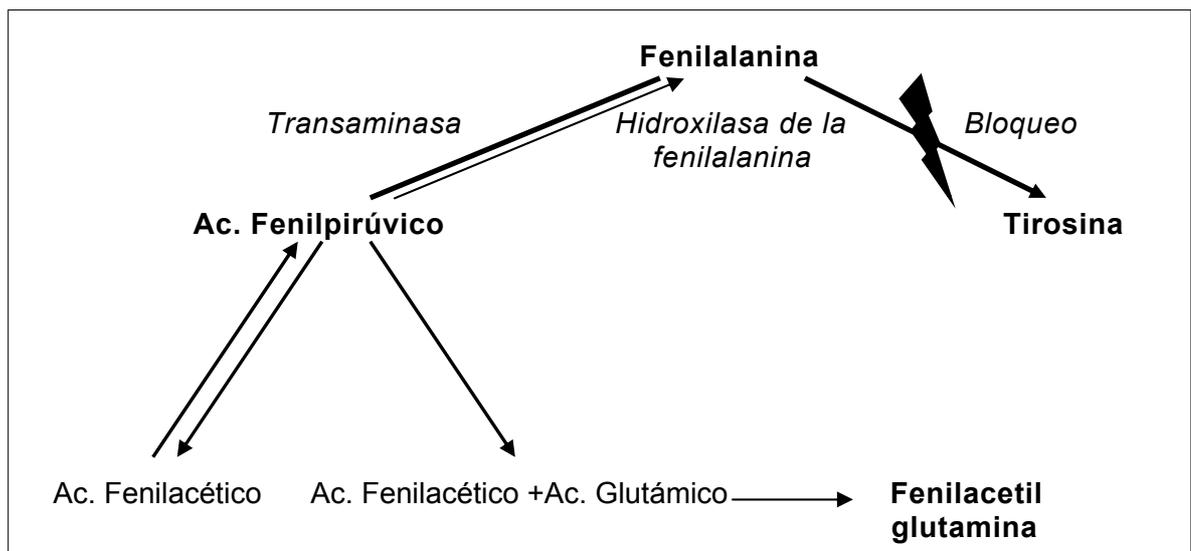
## TRABAJO PRÁCTICO Nº 2

### DETERMINACIÓN PRECOZ DE FENILALANINA

#### INTRODUCCIÓN

El *Screening* Neonatal básico de errores del metabolismo, denominado en primera instancia como errores congénitos del metabolismo, comprende las siguientes determinaciones: Fenilalanina (Fal), Hormona Estimulante de Tiroides (TSH) y Tripsina Inmunorreactiva (TIR). El mismo se realiza al Recién Nacido, y consiste en la búsqueda de desórdenes difíciles de reconocer clínicamente, sobre una muestra no seleccionada de la población. Por esta razón, resulta de fundamental importancia para aquellas enfermedades que carecen de síntomas específicos tempranos, produciendo daño severo e irreversible, y que son plausibles de tratamiento.

Como la leche contiene fenilalanina, el lactante afectado presentará una elevación del nivel de fenilalanina en plasma después de 1 ó 2 días, elevándose entre 1-6 sem. los niveles urinarios de Ac. Fenilpirúvico. La prueba de detección se hace en sangre, siempre que el niño haya sido alimentado con leche durante por lo menos 24 horas.



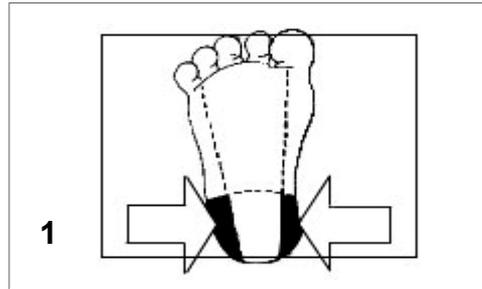
#### OBJETIVOS

- Adquirir destreza y practicidad en la extracción y manipuleo de la muestra para *screening* neonatal (sangre del talón del bebé).
- Incentivar al alumno a la formación de equipos diagnósticos interdis-ciplinarios a fin de lograr la mejor cobertura del paciente, dado que a través del diagnóstico y tratamiento precoz se obtiene la recuperación prácticamente total del mismo.
- Concientizar acerca de la necesidad del diagnóstico precoz de los errores del metabolismo desde el punto de vista social y económico.
- Formar criterio clínico para informar los hallazgos bioquímicos, mediante la interrelación de los conocimientos adquiridos y las técnicas de determinación seleccionadas.

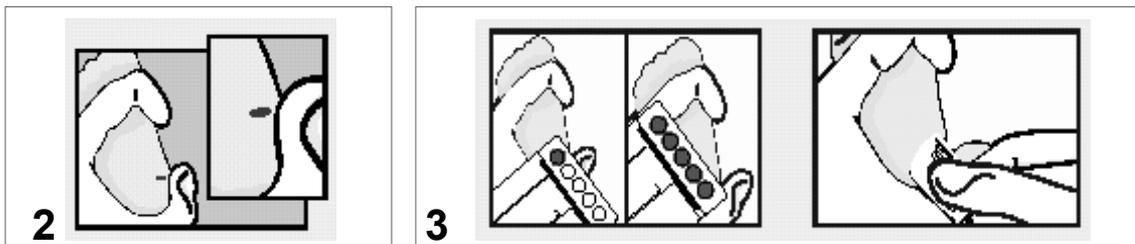
## Toma de Muestra

La muestra que se utiliza es sangre del talón del bebé obtenida por punción, preferentemente con lanceta estéril como "manchas" por goteo sobre tarjetas de Guthrie, y luego de 24 horas del inicio del consumo de leche tanto materna como de otro tipo. Es aconsejable, previa punción, aumentar la irrigación del talón del bebé por masaje o frotación vigorosa (aproximadamente 2 - 3 min) para luego impregnar la plantilla o tarjeta. Tener la precaución que la gota sea lo suficientemente gruesa, para evitar toques sucesivos en los círculos.

Posteriormente, con un sacabocados extraer los *spots* de sangre de la tarjeta.



*Las áreas sombreadas indican las zonas en que debe realizarse la punción.*

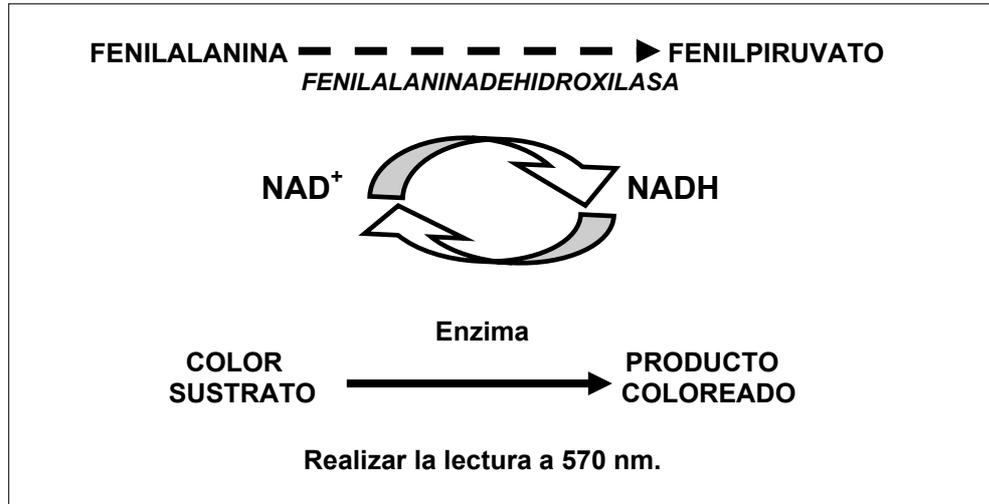


*Usando una lanceta hacer la punción.*

*Secar la primera gota, y esperar que la sangre fluya espontáneamente.*

## Determinación enzimática de la fenilalanina (Fal)

La técnica se fundamenta principalmente en la extracción ácida de la Fal de la muestra mediante el uso del ácido tricloroacético, realizando una transferencia manual del extracto para su posterior contacto con la solución neutralizante y los correspondientes reactivos desarrolladores de color (A + B), para finalmente medirlo a 550-570 nm.



### Técnica

1. Para los 5 estándares, 3 controles y desconocidos, colocar el círculo de sangre seca de 3/16'' o dos de 1/8'' de diámetro en los pocillos correspondientes de la placa colectora (de fondo plano). Dejar dos microceldas libres para blancos de aire.
  2. Agregar 120 ul de solución extractiva en cada microcelda. Tapar las microceldas con microfilm para evitar las evaporaciones.
  3. Rotar 90 minutos a temperatura ambiente (TA).
  4. Transferir cada extracto a otro pocillo correspondientemente rotulado en una nueva placa colectora de fondo plano.
  5. Agregar 50 ul de solución neutralizante a cada microcelda y agitar a mano durante 10". Tapar las microceldas con microfilm.
  6. Agregar 100 ul de reactivo A + B a cada microcelda y agitar a mano durante 10" y tapar las microceldas.
  7. Tapar las microceldas con microfilm. Incubar 45 minutos a temperatura ambiente.
  8. Leer a 540-570 nm y graficar sobre papel milimetrado la absorbancia en función de la concentración en mg/dl.
- El producto final es estable durante 10 minutos.

### CONTROL DE CALIDAD

El equipo cuenta con controles internos bajo, medio y alto que deben incluirse en cada ensayo. También pueden incluirse controles externos (p.e. CDC) conteniendo Fal en tres niveles diferentes.

CUT OFF sugerido para nuestra población: 3 – 10 mg/ml.

SENSIBILIDAD: 0,2 mg/dl.

### **BIBLIOGRAFÍA**

- GRAFF, LAURINE: *Análisis de Orina. Atlas color*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, 1983.
- COLOMBO C. M.; CORNEJO E. V.; RAIMANN B. E.: *Errores innatos en el metabolismo del niño*. Edit. Universitaria. Santiago, Chile, 2003.
- JARA ALBARRAN, A. *Endocrinología*. Edit. Panamericana, 2001.
- CHIESA, A.; GRUÑEIRO DE PAPENDIECK, L.: *Hiperfenilalaninemia, fisiopatología y pesquisa* Revista del Hospital de niños de Bs. As., Vm 36, 1994.
- COMITÉ NACIONAL DE NEFROLOGÍA PEDIÁTRICA: *Nefrología Pediátrica*. Sociedad Argentina de Pediatría, Buenos Aires, 2003.

## TRABAJO PRÁCTICO N° 3

### LITIASIS

#### **INTRODUCCIÓN**

Para comprender cómo las diferentes alteraciones metabólicas pueden dar lugar a la enfermedad litiásica, es preciso conocer el proceso de formación de los cálculos renales. Los mecanismos detallados de esta formación aún no se conocen, pero cualesquiera que estos sean, no pueden escapar a los mecanismos generales de toda transformación de fase líquida a fase sólida.

Por regla general, los cálculos están formados por una sustancia básica, acompañada por contaminantes que se han ido incorporando. Existen cálculos de origen biliar, renal, salival y fecal. Para un cálculo urinario la formación del mismo, se produce cuando la orina se ve sobresaturada de una determinada sustancia, esta precipita produciendo sales, y luego la nucleación de cristales. Si esta alteración persiste, los núcleos formados siguen una fase de crecimiento hasta desarrollar verdaderos cálculos por superposición entre ellos.

#### **OBJETIVOS**

- Reconocer, a través del análisis cualitativo de un cálculo, por ejemplo urinario, la composición química del mismo.
- Identificar los componentes de los cálculos, de manera de obtener información sobre las causas que los han formado.
- Permitir clasificar a los cálculos según su origen, formación, con el fin de realizar análisis complementarios, para evitar recidivas.

#### **MARCHA DE CÁLCULOS**

Una vez llegado el cálculo al laboratorio debe ser lavado y secado previamente. Si es grande debe partirse para estudiar su núcleo; en cambio, si es pequeño, debe pulverizarse.

#### **MÉTODO** (kit comercial)

<u>Componente</u>	<u>Tiemp. de reacción</u>	<u>Positivo</u>	<u>Negativo</u>
-------------------	---------------------------	-----------------	-----------------

#### **CARBONATO**

Polvo de cálculo CIH 1,2 molar 2 gotas	Instantáneo	Desprendimiento de gas (CO <sub>2</sub> )	Ausencia de gas
--	-------------	--	--------------------

En el mismo tubo seguir agregando CIH 1,2 molar: 20 gotas. Agitar a medida que se incorpora el ácido, para disolver el cálculo: Solución "S".

#### **MAGNESIO**

2 gotas de Sn. "S" 1 gota React. A 3 gotas NaOH 6,25 molar 1 gota React. B	Esperar 2 a 3 min.	Color rojo frambuesa o precip. rojo frambuesa	color amarillo o anaranjado
--	-----------------------	--	--------------------------------

Mezclar con palillo

---

### **FOSFATO**

---

2 gotas de Sn "S"	instantánea	color amarillo	Ausencia de
2 gotas de Rvo.	2 segundos	intenso estable	color amarillo
Mezclar con palillo			intenso o aparición tardía

---

### **AMONIO**

---

2 gotas Sn "S"	instantáneo	ppitado. ocre	sn. incolora
1 gota NaOH	2 segundos	denso estable	ppitado. blanco
6,25 Molar			amarillento
Mezclar con palillo			aparición tardía de precipitado

---

### **ÁCIDO ÚRICO**

---

1 gota Sn "S"	instantáneo	azul estable	ausencia de
2 gotas de Rvo."A"	2 segundos		color azul
Mezclar			
1 gota Rvo."B"			
Mezclar con palillo			

---

### **CISTINA**

---

3 gotas Sn."S"	esperar unos	lila o violeta	ausencia de
1 espat. Rvo.en polvo(tamaño cabeza de alfiler)	30 segundos	se desvanece en 5-10 min.	color lila o violeta.
Mezclar con palillo			
3 gotas Rvo."B".			
Mezclar con palillo			

---

### **CALCIO**

---

2 gotas Sn"S"	instantáneo	ppitado. rosa	ppitado. azul
2 gotas Rvo."A"	10 segundos	rosa-violeta estable.	azul verdoso.
1 espat. Rvo."B" (tamaño cabeza de alfiler)			
2 gotas NaOH 6,25 Molar			
Mezclar con palillo			

---

### **OXALATO**

---

1 espat. Polvo de cálculo (tamaño cabeza de alfiler)	instántaneo	azul o verde estable	ausencia de
1 gota Rvo.	10 segundos		color azul o verde.
Mezclar con palillo.			
4 gota Ac.Sulfúrico conc.			
Mezclar con palillo			

---



## **BIBLIOGRAFÍA**

- ZANCHETTA, J. R.; BOGADO C. E.: *Litiasis*. Ciencia Hoy. Vol. 1 (1). Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, 1989
- RAHMAN, R.; ALCONCHER, L.: *Litiasis e Hiper calciuria*. Comité Nacional de Sociedad Argentina de Pediatría. Nefrología Pediátrica. 31:426-438. Buenos Aires, 2003.
- JIMÉNEZ SÁNCHEZ, J.R.; GOMEZ CAMACHO, F.; CARMONA IBÁÑEZ, C.: *Litiasis biliar*. Revista de Gastroenterología y Hepatología II: 54-75.
- CASTRILLO, J. M.: *Litiasis renal*. Rev. Nefrología y Urología. III, 9-28.
- SINGHAL, G. D; SING., D. N; GOPAL, S. S., y col.: *Urinary Mucoprotein in Pediatric Urolithiasis*. Journal of Pediatric Surgery, Vol 22. N°3, 1987: 218-222.

## TRABAJO PRÁCTICO N ° 4

### PROTEINURIA - UROPROTEINOGRAMA

#### **INTRODUCCIÓN**

Las proteínas plasmáticas de pequeño peso molecular son filtradas normalmente en forma libre a través del glomérulo renal y luego son, en parte, reabsorbidas por los túbulos renales.

Hay condiciones fisiológicas o benignas donde se puede observar un aumento en la excreción urinaria de proteínas, como en el ejercicio violento, fiebre, hipotermia, embarazo.

La medición de las proteínas urinarias es importante para la detección de patologías renales. La proteinuria en la enfermedad renal puede resultar de una disfunción glomerular o tubular. En el primer caso se da por un aumento en el pasaje a través de los capilares del glomérulo y está caracterizada por la pérdida de proteínas plasmáticas de igual o mayor tamaño. En el segundo caso se da por una disminución en la capacidad en la reabsorción de proteínas por los túbulos.

#### **OBJETIVOS**

- Valorar las pérdidas proteicas que se producen por orina de acuerdo con la lesión túbulo-glomerular.
- Identificar patrones electroforéticos que nos permitirán clasificar los tipos de proteinuria.

#### **MÉTODO COLORIMÉTRICO CUANTITATIVO** (kit comercial)

Las proteínas presentes en la muestra reaccionan en medio ácido con el complejo rojo de pirogalol - molibdato, originando un nuevo complejo coloreado que se cuantifica espectrofotométricamente a 600 nm.

Muestra: orina de 24 horas u otro líquido biológico.

#### Técnica

-Medir la diuresis, y en caso de turbidez es conveniente centrifugar previamente la muestra.

-En 3 tubos

Blanco	Estándar	Muestra
----	20 ul	----
----	----	20 ul
1ml de Rvo.	1ml de Rvo.	1ml de Rvo.

-Mezclar e incubar durante 10 minutos a 37 °C.

-Leer en espectrofotómetro a 600 nm., llevando a cero el aparato con el Blanco.

Cálculos:

$$\text{Prot. mg /24 hs.} = D / S \times V \times 1000$$

V = volumen de la diuresis expresado en lts/24 hs.

1000= mg/l del estándar

$$\text{Prot. en Orina ocasional: mg/dl proteínas} = D/S \times 100$$

#### VALORES DE REFERENCIA:

Orina de 24 horas: 30-140 mg/24 horas (hasta 160 mg/24 horas en embarazadas).

Orina ocasional: 25 mg/dl.

## UROPROTEINOGRAMA

### Técnica de precipitación con Nitrato de Plata

Es una técnica alternativa para la revelación de la electroforesis de proteínas en líquidos biológicos, la cual resulta de elección frente a las técnicas de concentración comúnmente utilizadas. La ventaja de la utilización de esta técnica es que se obtienen resultados reales de la presencia de proteínas en líquido mediante la precipitación y fijación de las mismas, por lo que se salvarían las pérdidas que caracterizan a las otras técnicas.

### Técnica

Se realiza una electroforesis convencional de las proteínas del líquido biológico y se procede como sigue:

1. Fijación en TCA/SSA (Tricloroacético/Sulfosalicílico).....5 min
2. Tres Lavados seguidos con agua destilada.....5 min c/u
3. Preparación de Ag coloidal
4. Tratamiento con Ag (mezclar la Ag con el Rto.Fe en el momento).....3-5 min
5. Tres lavados con agua destilada.....5 min c/u
6. Tonalización
7. Transparentización (ídem PTG común)

### Reactivos

**a.- Fijador:** TCA (10%) más SSA (5%) en partes iguales. Precipitan las proteínas y facilitan de esta manera su fijación al acetato de celulosa.

**b.- Reactivo de Plata:**

- 1) Nitrato de Ag 3,9 gr/20 ml agua dest.
- 2) Reactivo Ferroso  
Tween 20-----0,25 ml  
Sulfato ferroso (Anhidro)----- 0,79 gr

(Tb. puede utilizarse sulfato ferroso heptahidratado pero 1,4 gr y tener cuidado por la osmolaridad).

- 3) Citrato de Sodio----- 1,70 gr
- 4) Agua destil. c.s.p. p/100ml

Este reactivo ferroso es estable un mes conservándolo sin cámara de aire.

Preparar el reactivo total al momento de utilizar sobre las tiras corridas en la siguiente proporción: 8 ml Rvo. Ferroso más 2 gotas de Nitrato de Ag. Debe dar color caramelo y no se reutiliza. El sulfato ferroso genera el pasaje de  $Ag^0$  a  $Ag^+$ , que tiene gran avidez de pegado.

**c.- Tonalizador:**

- 1) Ferricianuro de Potasio----- 11 gr/l
- 2) Acido Oxálico----- 12 gr/l
- 3) Cloruro Férrico-----24 gr/l

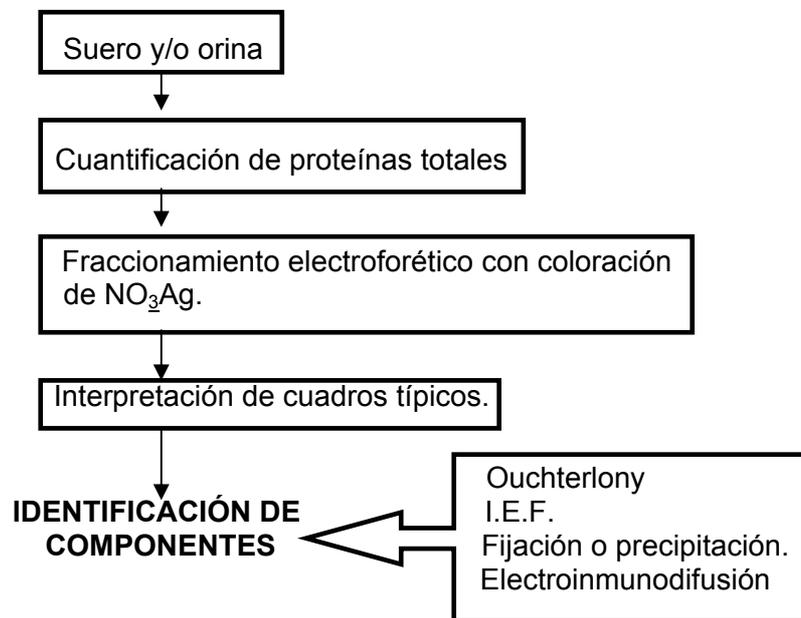
Mezclar en el momento un volumen de cada uno. El cloruro férrico produce el pasaje de  $Ag^+$  a  $Ag^0$  que se intercambia in situ con el ferricianuro, dando color azul (azul de Prusia) y mejorar la visualización.

La tonalización es un paso que puede obviarse dado que las bandas obtenidas con la técnica de nitrato de plata son perfectamente visibles e identificables, y, de esta manera se elimina el riesgo de perder algunas bandas.

**Cuadro N°1:** Alteraciones en diferentes perfiles proteicos. Ver ANEXO

	<i>Prot Tot</i>	<i>Alb</i>	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\beta$	$\gamma$
Sínd. nefrótico	↓	↓	↘	↘	↘	↘
Ins renal crónica	↓	↓	↘		↘	↘
$\gamma$ -patía monoclonal	↗	↘				↗
Reacción fase aguda	↘	↓	↑	↗		↑(PCR)
Artr. reumatoide	↘	↑		↗ ↑(PCR)	↗	
Anemia ferropénica					↑	
Hepatopatía crónica	↘	↓	↘	↘	↘	↑

### MARCHA DE PROTEÍNAS PARA LÍQUIDOS BIOLÓGICOS



### BIBLIOGRAFÍA

- ZUKAS, PEDRO A.: *Proteinograma Electroforético: Imágenes e interpretación.* Editorial Colmegna, Santa Fe, 1983
- SCARPIONI-HEER: *Fisiopatología proteica en las nefropatías.* Editorial Panamericana.
- FARRERAS VALENTI, P. ROZMAN, C; DANELL, A.: *Medicina Interna.* Editorial Dayma, España, 1988
- COMITÉ NACIONAL DE NEFROLOGÍA PEDIÁTRICA. *Nefrología Pediátrica.* Sociedad Argentina de Pediatría, Buenos Aires, 2003

**TRABAJO PRÁCTICO Nº 5**  
**ESTUDIO DEL FUNCIONAMIENTO RENAL.**  
**DEPURACIÓN DE CREATININA ENDÓGENA (D.C.E.)**

**INTRODUCCIÓN**

La creatinina se forma por condensación de la creatina, reacción espontánea en el organismo, y dado que la mayor parte se encuentra en el músculo, la valoración de la creatinina presente en una persona refleja su masa corporal. Por ello niños, mujeres y ancianos tienen niveles menores que los hombres.

La creatinina, una vez formada, es filtrada libremente por el glomérulo, no es reabsorbida en los túbulos renales y es eliminada exclusivamente por excreción renal, por lo que su cuantificación se emplea para vigilar este proceso y para estimar la función renal. Por lo general, el dosaje de creatinina en suero se utiliza con mayor frecuencia para tener una noción en el seguimiento de la función renal; sin embargo, su relación con los niveles de creatinina en orina es el método más recomendable como medida de la filtración glomerular. Esta relación se denomina *clearance* de creatinina o depuración de creatinina endógena.

**OBJETIVOS**

- Reconocer la importancia de la realización del *clearance* de creatinina, en muestras provenientes de pacientes ambulatorios e internados, para el estudio y seguimiento de la función renal.
- Adquirir destreza y formar criterio clínico para interrelacionar los diferentes hallazgos bioquímicos en el paciente renal.

**MÉTODO CINÉTICO**

**Fundamento**

La creatinina reacciona con el picrato alcalino (reacción de Jaffé) produciendo un cromógeno que se mide a 500 nm. La velocidad de esta reacción, bajo condiciones controladas, es una medida de la concentración de creatinina en la muestra.

Muestra: Suero: obtenido de la manera usual.

Orina: recoger orina de 24 hs. o de 2 hs. Medir la diuresis y efectuar una dilución 1:50 de la misma. En caso que la diuresis sea de 2 hs. multiplicar el volumen medido por 12 para calcular la cantidad de Creatinina eliminada durante 24 hs.

Técnica

Rvo. de Trabajo: de acuerdo con el volumen de trabajo, mezclar partes iguales de Ac. Pítrico y de Buffer / PLE. Si enturbia o precipita redissolver en baño de agua a 37°C antes de usar.

-En 2 tubos o cubetas espectrofotométricas marcadas:

	<b>S</b>	<b>D</b>
<b>Rvo.de trabajo</b>	1 ml.	1 ml.
<b>Estándar</b>	0,2 ml.	----
<b>Muestra</b>	----	0,2 ml.

-Mezclar inmediatamente, disparando al mismo tiempo el cronómetro y proseguir la incubación. A los 30" exactos medir la absorbancia ( $S_1$  y  $D_1$ ), continuar la incubación. Medir nuevamente la absorbancia ( $S_2$  y  $D_2$ ) a los 5 minutos (4 min. 30 seg. después de la primera lectura). La medición a los 30" se realiza para eliminar los reactivos de fase rápida y, consecuentemente, con la medición de los 5 minutos se eliminan los de reacción más lenta, quedando enmarcado en el intervalo de tiempo la reacción buscada de creatinina.

Cálculo

$$\text{Creatinina en suero mg/lit} = (D_2 - D_1) \times f \quad f = \frac{20 \text{ mg/lit}}{S_2 - S_1}$$

$$\text{Creatinina en orina gr/24hs} = \frac{(D_2 - D_1) \times V \times 50 \times 0,020}{(S_2 - S_1)}$$

siendo :

**V** = volumen de la diuresis expresado en lt./ 24 hs.

**50** = dilución realizada.

**0,020 g/l** = 20 mg/l = concentración del Estándar

**Depuración de Creatinina endógena (D.C.E.):**

$$\text{D.C.E. ml/min.} = \frac{\text{Creatinina en orina (gr/24 hs)} \times 694 \text{ ml/min.}}{\text{Creatinina en suero (mg/lit)}}$$

donde:

$$694 \text{ ml/min} = \frac{\text{gr/24hs}}{\text{mg/lit.}} = \frac{1000 \text{ mg} \times 1000 \text{ ml.}}{1 \text{ mg} \times 1440 \text{ min}} = \frac{1.000.000 \text{ ml.}}{1440 \text{ min.}}$$

#### VALORES DE REFERENCIA

**Suero:** 8 - 14 mg/lt.

**Orina:** 0,9 - 1,5 gr/24 hs.

**D.C.E.:** 80 - 140 ml/min (promedio 125 ml/min) para adultos hasta 60 años

#### **MODELO DE INFORME:**

**Paciente** :.....  
**Volumen de orina** : ml ( aclarar si es por 24 hs. o 2 hs.)  
**Suero** : mg / lt.  
**Orina** : gr / 24 hs.  
**D.C.E.** : ml / min.

#### ***BIBLIOGRAFÍA***

PESCE A. J.; KAPLAN L. A. *Química Clínica: Métodos*. Ed. Médica Panamericana 2; Buenos Aires, 1990, pp. 29-36.

GUYTON-LEVY: *Fisiología*. Editorial Interamericana, 1997

FARRERAS VALENTI, P. ROZMAN, C; DANELL, A. *Medicina Interna*. Editorial Dayma, España, 1998

COMITÉ NACIONAL DE NEFROLOGÍA PEDIÁTRICA: *Nefrología Pediátrica*. Sociedad Argentina de Pediatría. Buenos Aires, 2003.

**TRABAJO PRÁCTICO N° 6**  
**LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO (LCR)**

**INTRODUCCIÓN**

El LCR se forma en los plexos coroideos, no por simple difusión o diálisis sino por un proceso de secreción y transporte activo. La velocidad media de formación y absorción es de alrededor de 135 ml/min, un proceso constante de diálisis si tiene lugar a través de la membrana aracnoides en todos los niveles, con intercambio de componentes químicos entre el LCR y la sangre, principalmente moléculas de bajo peso molecular.

El LCR actúa como un *buffer* y/o como almohadilla protectora (amortiguación) del encéfalo y médula espinal, contra los efectos de las ondas de presión externa. Su pH está en equilibrio con el pH del líquido extracelular del sistema nervioso, influye en la ventilación, el flujo sanguíneo cerebral y con diversos aspectos del metabolismo cerebral.

El volumen total del LCR en el adulto normal es de 100-130 ml. El líquido normal es claro e incoloro y su extracción es por punción lumbar. Su composición química y característica física se describen en el siguiente Cuadro.

CARACTERÍSTICAS		RANGO DE REFERENCIA
Presión		50-200 mm. H <sub>2</sub> O
Volumen		120-140 dl.
Densidad		1,003-1,008
Células	Adultos	0-5 mononucleares
	Infantes	0-20 monucleares
Proteína total (principalmente Albúmina)		10-45 mg/dl
Globulina		0-6 mg/dl
Oro cooidal (Lange)		0001/10.000
Nitrógeno ureico		5-10 mg/dl
Creatinina		0,4-2,2 mg/dl
Nitrógeno no proteico		12-30 mg/dl
Ácido Úrico		0,3-1,5 mg/dl
Glucosa		50-85 mg/dl
Sodio		144 mEq/l
Cloruro		120-130 mEq/l
Calcio		4-7 mg/dl
Fosfato		1,2-2 mg/dl
Magnesio		1-3 mg/dl
Potasio		2,06-3,86 mEq/l
colesterol		0,06-0,5 mg/dl

**OBJETIVOS**

- Evaluar posibles alteraciones meníngeas que comprometan la vida del paciente.
- Relacionar con diferentes cuadros meníngeos, que pudieran provocar una epidemia.
- Facilitar los medios diagnósticos para la pronta evolución de las patologías que afectan al SNC.

Muestra: por punción entre la 4ta. y 5ta. vértebra lumbar, previa desinfección de la piel y anestesia local.

Recoger en 2 tubos:  - Tubo estéril  
- Tubo s/ anticoagulante

### **Ex. Físico**

- a) **Aspecto:** cristal de roca, cristalino, límpido, turbio, opalescente, etc.  
b) **Color:** incoloro, blanco opalescente, rojizo, xantocrómico.  
c) **Red de fibrina:** presencia o no.  
d) **Presencia de coágulo.**

### **Ex. Citológico**

#### **a) Recuento celular**

Reactivos: Líquido de dilución: Ac. acético puro .....10 ml.  
agua dest. ....90 ml.

Técnica: efectuar una dilución al medio y cargar la cámara de Neubauer, contándose los glóbulos blancos en los 9 cuadrados:

$$\text{Cel./ mm}^3 = \text{N}^\circ \text{ elem. contados} \times 2,22$$

donde:

**2,22** = factor de corrección

#### VALORES DE REFERENCIA

Adultos:..... 2 -3 cel / mm<sup>3</sup>  
Niños menor 1 año:.....hasta 30 cel / mm<sup>3</sup>  
Niños 5 años hasta pubertad:.....hasta 10 cel / mm<sup>3</sup>

#### **b) Predominio celular**

$$\text{N} = \text{predominio de linfocitos / mm}^3$$

### **Ex. Químico**

#### **a) Proteínas**

**REACCIONES GLOBULÍNICAS:** si los líquidos son turbios deben centrifugarse, ya que son reacciones de enturbiamiento.

##### a.1.- Reacción de Pandy (mayor sensibilidad)

Reactivo: Fenol p.a. cristalizado .....10 gr.  
agua dest.....100 ml.

Colocar en un frasco con tapa, agitar hasta emulsionar y llevar a 37°C, dos a tres días con agitación frecuente. Dejar reposar y utilizar la capa superior.

Técnica: en un tubo de hemólisis colocar 1 ml. del Rvo. Fenólico más una gota de LCR. Agitar.

##### Interpretación

- **Positivo:** enturbiamiento que se califica de **(+) a (++++)**

##### a.2.- Reacción de Nonne - Apelt

Reactivo : Sulfato de amonio p.a. ....85 gr.  
agua dest.....100 ml.

Técnica: en un tubo de hemólisis colocar 0,1 ml. de Rvo. sulfato y 0,1 ml. de LCR (trabajar siempre en partes iguales, es decir gota a gota). Agitar y observar a los tres minutos.

Interpretación

- **Positivo:** clasificar el enturbiamiento de **(+) a (++++)**

**REACCIÓN CUANTITATIVA**

Técnica: usar el método colorimétrico cuantitativo para la determinación de proteínas en orina y/o otros líquidos biológicos.

Cálculo

$$\text{Prot. en LCR mg/dl} = D / S \times 100$$

VALORES DE REFERENCIA

Personas sanas.....15 -- 45 mg/dl .  
Mayores de 60 años.....hasta 60 mg/dl.

**b) Glucosa**

Método enzimático de glucosa - oxidasa

VALORES DE REFERENCIA

0,50 -- 0,80 gr/lt.

**a) Cloruros**

Método colorimétrico

VALORES DE REFERENCIA

0,720 -- 0,750 gr/lt.  
114 -- 118 mEq./ lt.

**d) Enzimas**

-LDH (método enzimático)

VALORES DE REFERENCIA → hasta 45 UI./ lt

-ADA (método enzimático)

VALORES DE REFERENCIA → hasta 8,5 UI/lt

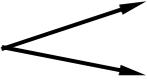
**e) Otras determinaciones:** VDRL, Toxo, subtipos de Igs, etc.

**MODELO DE INFORME:**

<b>- Ex. Físico:</b>	Aspecto
	Color
	Red de fibrina
	Presencia de coágulo
<b>- Ex. Citológico:</b>	Recuento celular = ...../ mm <sup>3</sup>
	Predominio = ...../ mm <sup>3</sup>
<b>- Ex. Químico:</b>	Proteínas : Reac. globulínicas
	Reac. cuantitativa
	Glucosa
	Cloruros
	Enzimas: LDH
	Investigación serológica

## LÍQUIDOS DE PUNCIÓN

Muestra: se obtiene por punción quirúrgica, en condiciones de asepsia.

Recoger en 2 tubos:  - Tubo estéril  
- Tubo con anticoagulante (citrato de sodio)

Características diferenciales entre exudados y trasudados

	TRASUDADO	EXUDADO
<b>Color</b>	Amarillo claro	Variable
<b>Aspecto</b>	En geral. límpido	Seroso, purulento, hemorrágico
<b>Densidad</b>	Menor a 1,018	Mayor a 1,018
<b>Coagulación</b>	Ausente o muy tenue	Casi siempre presente
<b>Proteínas</b>	Menor de 3 gr/100 ml.	Mayor de 3 gr/100ml.
<b>R. de Rivalta</b>	(-) negativa	(+) positiva
<b>Células</b>	Predominio de cel. endoteliales	Predominio de PMN, linfocitos, GR (según proceso)

## LÍQUIDO SINOVIAL

El líquido sinovial ocupa la cavidad articular y actúa como lubricante, manteniendo un grado mínimo de fricción entre los huesos durante el movimiento o durante la sustentación del peso corporal. Este líquido también aporta la única nutrición destinada al cartílago a través de un proceso de difusión.

El líquido sinovial es un dializado de plasma mezclado con ácido hialurónico. Está formado por la ultra filtración a nivel de la rica red vascular del tejido sinovial, mientras que el ácido hialurónico, una mucoproteína, es segregado por células sinoviales tipo B.

El volumen líquido en la articulación normal depende del tamaño de la misma, pudiendo variar por ejemplo, en la articulación de la rodilla, entre 0,1 a 3,5 ml de líquido.

### OBJETIVOS

- Disponer de pruebas diferenciales para el diagnóstico de patologías reumatológicas.
- Proveer de las condiciones óptimas para la obtención de la muestra y posterior análisis.

**MUESTRA.** Se obtiene por punción de la articulación afectada, en condiciones de asepsia.

Recoger en 4 tubos:

- tubo estéril → Bacteriología
- tubo c/ anticoagulante (EDTA) → Recuento celular
- tubo c/ antiglucolítico → Glucosa
- tubo s/ anticoagulante → Ex. físico y químico

	<b>Características Físico - Químicas</b>
<b>Volumen</b>	menor a 3,5 ml
<b>Aspecto</b>	claro, incoloro
<b>Viscosidad</b>	alta
<b>Coágulo de fibrina</b>	ausente
<b>Coágulo de mucina</b>	bueno
<b>Nº de células</b>	menor 200 / mm <sup>3</sup>
<b>Leucocitos PMN</b>	menor 25%
<b>Diferencia glucosa (entre suero y sinovia)</b>	menor 10 mg/ 100 ml
<b>Proteínas</b>	menor 2,5 gr%
<b>LDH</b>	diferencia entre suero y sinovia
<b>Ácido Úrico</b>	diferencia entre suero y sinovia
<b>Factor reumatoideo</b>	realizar simultáneamente en sangre y sinovia
<b>Complemento</b>	ídem determinación anterior
<b>Cristales</b>	Observación microscópica entre p.o. y c.o. (con microscopio de polarización) de los cristales birrefringentes extra e intracelulares: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Urato monosódico</li> <li>- Dehidrato de pirofosfato cálcico</li> <li>- Colesterol</li> </ul>

### **BIBLIOGRAFÍA**

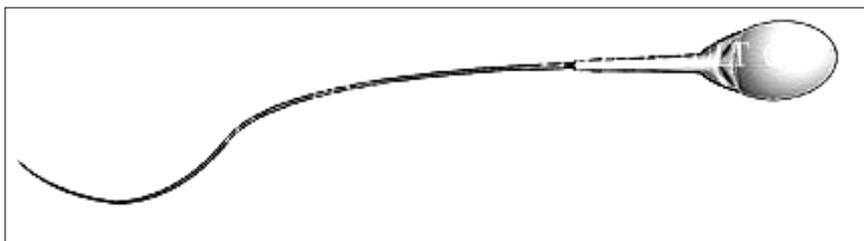
- ADAMS R.D.; VICTOR, M; ROMPER A. H.: *Principios de Neurología*, 6° edición en castellano. Mc Graw Hill- Interamericana, 1999: 11-16.
- DE MYER W.: *Técnica del examen Neurológico*. Texto programado 3° edición Médica Panamericana S.A., 1982: 497- 513.
- ANDERSON - COCKAYNE: *Química Clínica* editorial Interamericana Mc Graw Hill 1993, Philadelphia, Pennsylvania (USA).
- RINALDI, M.R.; ARDANAZ OTAÑO, S; NOTARIO, RD.: *Líquido Cefalorraquídeo.*, Editorial Panamericana, 1982.
- SCHUMACHER, H.R.; REGINATO, A.J.: *Atlas of Synovial Fluid, Análisis and Cristal Identification*. Lea & Febiger, 1991, USA.
- KHAMASHTA, M.A.; FRANCO, J.F.; HUGHES, GRV.: *Enfermedades autoinmunes del Tejido. Conectivo*. Editorial Doyma, 1992.

## TRABAJO PRÁCTICO N° 7

### ESPERMOGRAMA

#### INTRODUCCIÓN

Para evaluar la fertilidad masculina es de gran importancia un buen análisis del semen. Las principales características morfológicas del espermatozoide humano (50-60 micras de long.) permiten diferenciarlo en dos segmentos: la cabeza y la cola. En esta última debe considerarse la pieza intermedia o cuello.



#### OBJETIVOS

- Realizar una primera observación de la fertilidad masculina.
- Facilitar el diagnóstico y tratamiento de la infertilidad, si lo hubiera.
- Proveer de determinaciones específicas para la confirmación de anomalías en la fertilización.

#### 1.- Método de recolección

- Masturbación en el laboratorio
- Masturbación en el domicilio
- Preservativo de material inerte y sin espermicida

#### 2.- Recolección

En un frasco de boca ancha, limpio y seco. Rotular con el nombre del paciente, método de recolección y hora de emisión.

#### 3.- Examen físico

- Color: blanco amarillento, blanco grisáceo, amarillo, rojizo, etc.
- Aspecto: translúcido, ligeramente opalescente, opalescente, turbio, etc.
- Viscosidad: Determinar la misma una vez que se ha producido la licuefacción total del eyaculado. Evaluando su aspecto homogéneo o heterogéneo. *Resultado*: Normal o Aumentado.

d) Volumen: medir en una probeta graduada.

VALORES DE REFERENCIA → 2,0 - 6,0 ml.

e) pH: utilizar papel indicador de buena calidad de rango : 7,5 - 8,4

VALORES DE REFERENCIA → 7,8 - 8,2

#### 4.- Examen microscópico

a) Movilidad

Colocar una gota de esperma entre p.o. y c.o. , observar en 400 X y determinar por conteo porcentual los espermatozoides móviles (en sus distintos grados) y los inmóviles.

- **Móviles %**
- **Inmóviles %**

**Grado 3** (traslativos rápidos).  
**Grado 2** (traslativos lentos).  
**Grado 1** (móviles in situ).

b) Estudio de los elementos agregados:

Recorrer el preparado realizando una guarda griega en 100 X y buscar: conglomerados de espermatozoides, plocitos, Trichomonas vaginalis u hominis, cristales de fosfato de espermina, concreciones prostáticas, etc.

c) Recuento de espermatozoides (densidad de espermatozoides / ml):

Sobre la base de la cantidad observada en el punto a) se efectuará una dilución 1/5; 1/10; 1/20; 1/50, o, si la cantidad es muy escasa se diluirá al 1/2. Se debe contar en el cuadrado de los rojos de la Cámara de Neubauer.

Se pueden usar como diluyentes: - Agua destilada

- Sn de Macomber: NaCO<sub>3</sub> 5% en Formol 1%

- agua destilada

Ej.: si efectuamos una dilución 1/20, se tendrá:

$$\text{N}^\circ \text{ de espermatozoides/ml} = \frac{n \times 400 \times 10 \times 1000 \times 20}{80}$$

donde:

**n:** n° de espermatozoides contados en 80 cuadraditos

**400:** n° de cuadraditos que hay en 1 mm<sup>2</sup>

**80:** n° de cuadraditos contados

**10:** altura de cámara

**20:** dilución empleada en el ej. citado

**1000:** para llevar de mm<sup>3</sup> a cm<sup>3</sup>

d) Recuento de espermatozoides absoluto (optativo):

$$\text{Rcto. Absoluto} = \text{N}^\circ \times \text{vol. total de eyaculado}$$

Donde **N°:** n° de espermatozoides/ml

e) Test de la eosina

Sobre un p.o. se mezclan bien una gota de eosina 0,5% en Sn. Fisiológica y una gota de esperma, colocar un c.o. y observar al microscopio realizando un porcentual de los espermatozoides eosina positiva (necrosados).

f) Test de la peroxidasa

Sobre un p.o. colocar 1 gota de peroxidasa + 1 gota de agua oxigenada + 1 gota de esperma. Colocar un c.o. y observar al microscopio en 400 X, visualizando las células redondas.

$$\text{Rto de Cel. redondas} \longrightarrow \% \text{ peroxidasa (+)}$$

VALORES DE REFERENCIA:  $\longrightarrow$  hasta  $1 \times 10^6$  leucocitos

g) Fórmula espermática

Se realiza un extendido más grueso o más fino, dependiendo del n° de espermatozoides. Si el recuento espermático fuera bajo, deberá centrifugarse la muestra y realizar el extendido con el pelex. Dejar secar a temperatura ambiente y coloreándolo con técnica de Papanicolau o Hematoxilina-Eosina.

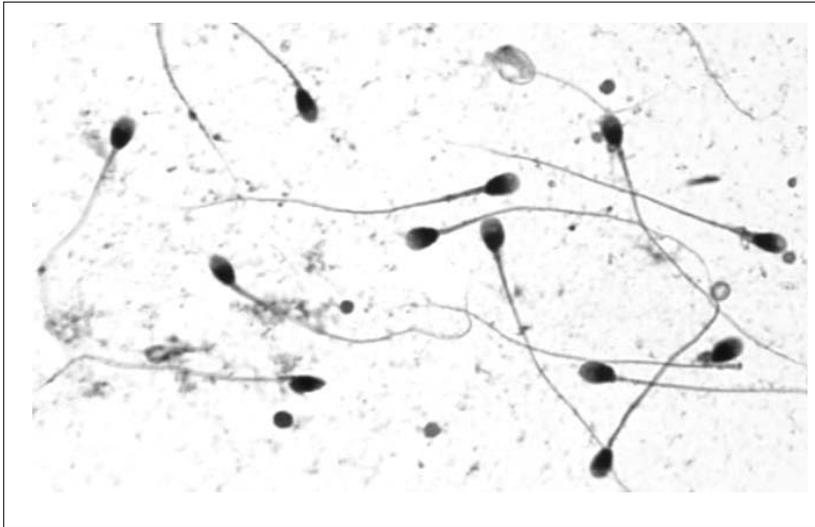
Observar en 1000 X y contar como mínimo 200 elementos. Detectar formas anormales de la estructura del espermatozoide.

VALORES DE REFERENCIA: > 30% de formas morfológicas normales

% anomalías de cabeza: \_\_\_-%

% anomalías de cuello: \_\_\_-%

% anomalías de cola: \_\_\_-%



Observación microscópica de una muestra de semen (400 X)

h) Recuento diferencial:

Informar la presencia de células de la progenie, por recuento %.



Observación microscópica de alteraciones morfológicas en una muestra de semen (400 X)

## MODELO DE INFORME

<b>ESPERMOGRAMA MORFOLÓGICO:</b>	
<b>EXAMEN MACROSCÓPICO:</b>	Color.....
	Aspecto.....
	Viscosidad.....
	Volumen.....ml
	pH.....
<b>EXAMEN MICROSCÓPICO:</b>	Espermatozoides:.....aislados
	.....agrupados
	.....aglutinados
	Leucocitos
	Hematíes
	Otras células
	Otros elementos
a) Movilidad:	
- Móviles %	.....% Grado 3 (traslativos rápidos)
	.....% Grado 2 (traslativos lentos)
	.....% Grado 1 (móviles "in situ")
- Inmóviles %	.....% Grado 0 (eosina negativa)
	.....% Necrosados (eosina positiva)
b) Recuento:.....	Espermatozoides / ml.
	..... Recuento absoluto/ ml.
c) Recuento diferencial:	
	- Células de la pro genie.....%
	- Leucocitos .....%
	- Otras células.....%.
d) Fórmula espermática:	
	- Espermatozoides normales.....%
	- Espermatozoides inmaduros.....%
	- Anomalías de cabeza.....%
	- Anomalías de cuello.....%
	- Anomalías de cola.....%
	- Anomalías predominantes.....%

## **QUÍMICA DEL PLASMA SEMINAL**

Separar el plasma seminal a los 60 minutos de obtenida la muestra, por centrifugación a 3500 rpm -- 20 min. Guardar entre 0 -- 4°C, en caso de no poder efectuar las pruebas inmediatamente.

### a) Fructosa

Indicador de la función de las vesículas seminales como así también del estudio de la permeabilidad de la vía seminal. La determinación cuantitativa de esta cetona se basa en la reacción de Seliwanoff.

**VALORES DE REFERENCIA** → 150 -- 450 mg%

### b) Ac. cítrico

Indicador de la función prostática, se utiliza también para valorar la respuesta fisiológica de la glándula al estímulo andrológico. En medio anhidro a 37°C el ácido cítrico forma un compuesto de condensación con la piridina de color amarillo.

**VALORES DE REFERENCIA** → 350 -- 670 mg%.  
α glucosidasa

Se utiliza como marcador epididimario. Existen 2 isoenzimas en el plasma seminal, la predominante es neutra y se origina en el epidídimo, la ácida proviene de la próstata.

VALORES DE REFERENCIA —————> > 20 mU / eyaculado

### PLASMA SEMINAL

#### Determinaciones químicas

- a) Fructosa.....mg%
- b) Ac. Cítrico.....mg%
- c)  $\alpha$  glucosidasa .....mU/eyac.

### ***BIBLIOGRAFÍA***

CALAMERA, J.C.; BRUGO OLMEDO, S.: *Manual de Prácticas de Laboratorio en Reproducción Humana*. Buenos Aires, Edita S.A., 1999.

OMS.: *Manual de Laboratorio de la OMS para el Examen del Semen Humano y de la Interacción entre el Semen y el Moco Cervical*. Editorial Panamericana, 1992.

CALAMERA, J.C.: *Morfología espermática para todos*. Ediciones Científicas.

**TRABAJO PRÁCTICO N° 8**  
**GONADOTROFINA CORIÓNICA HUMANA (GCH)**

---

**INTRODUCCIÓN**

La GCH es una glucoproteína compuesta por dos cadenas polipeptídicas  $\alpha$  y  $\beta$ , cuya especificidad biológica está determinada por los 30 aminoácidos carboxilo-terminales de la subunidad  $\beta$ . Se sintetiza en el sincicio trofoblasto, tanto en un embarazo normal como en uno patológico; en células germinales masculinas y, por tanto, en tumores de células germinales (seminoma y teratoma).

La determinación de la GCH puede realizarse en suero y/o orina mediante técnica de aglutinación directa, inhibición de la aglutinación, ELISA, etc., mientras que su dosaje puede realizarse por MEIA o por RIA.

**OBJETIVOS**

- Adquirir conocimiento acerca de la acción biológica de la GCH en relación con su evolución durante el embarazo normal y patológico.
- Proveer el adiestramiento necesario para su determinación por los distintos métodos citados, tanto para su detección cualitativa como cuantitativa.

**METODOLOGÍAS ALTERNATIVAS**

**1.- Método por inhibición de aglutinación**

La muestra de orina se pone en contacto con suero de conejos anti-HCG humana y partículas de látex que tienen absorbidas moléculas de HCG en su superficie. La HCG presente en orina de mujeres embarazadas reacciona con el antisuero e inhibe la aglutinación de las partículas de látex, observándose una suspensión homogénea. Ausencia o niveles no detectables de HCG en la muestra, se traduce en la aglutinación del látex por reacción con los anticuerpos del anti-HCG- $\beta$  que no han sido bloqueados.

Muestra: orina, preferentemente la primera de la mañana.

Técnica

En cada sección de la placa colocar:

Muestra.....1 gota

Rvo. Anti-HCG- $\beta$ .....1 gota

Mezclar con varilla durante 15 – 30 seg.

Rvo. látex-HCG.....1 gota

Mezclar con varilla durante 5 seg. Extender la suspensión en toda la sección.

Disparar el cronómetro. Balancear la placa y observar el resultado obtenido, dentro de los 2 minutos de reacción.



### Interpretación del resultado

- **POSITIVO:** No aglutinación. La suspensión se mantiene homogénea dentro de los 2 minutos de reacción. El resultado se interpreta como presencia de HCG.
- **NEGATIVO:** Aglutinación. Se forman finos grumos en la suspensión dentro de los 2 min. de reacción. El resultado se interpreta como "Cantidad no detectable de HCG" en la muestra.
- **SENSIBILIDAD:** detecta HCG en orina a partir de niveles de 1,5 UI/ml.

### **2.-Tira reactiva para la detección de HCG en orina**

El *EVENT test strip* HCG es una tira reactiva para el diagnóstico del embarazo, basada en la detección directa de la HCG en la orina con ayuda de un anticuerpo monoclonal marcado.

#### Técnica

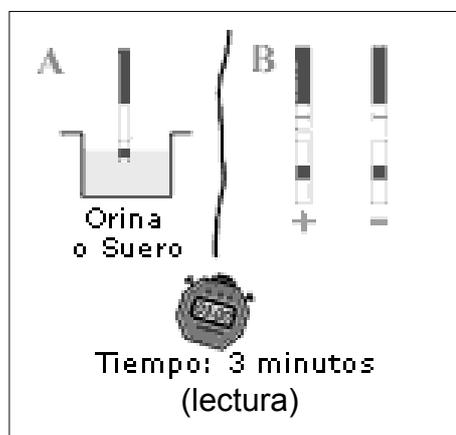
Preparar un tubo de ensayo que contenga la muestra de orina. El volumen mínimo de muestra debe ser 1 ml. y no debe sobrepasar la marca del nivel máximo impreso en la tira.

Tomar una tira *EVENT test* y sostenerla por el extremo azul. Colocarla en el tubo con la muestra donde debe permanecer 5 minutos extraer la tira reactiva de la orina y leer el resultado en la zona de reacción.

La tira puede ser sumergida también en la muestra de orina durante 20 segundos, poniendo cuidado en no sobrepasar la marca del nivel máximo. Luego debe permanecer en una superficie plana para que tenga lugar la reacción, cuyo resultado puede leerse al cabo de tres minutos.

### Interpretación del resultado

- **NEGATIVO:** una línea indica resultado negativo. La CGH está ausente de la muestra, o está presente en una concentración inferior al límite de detección. La línea rosa superior aparece tanto si el resultado es negativo como positivo, se trata de un control incorporado que indica el buen funcionamiento del ensayo y que el procedimiento ha sido correcto.
- **POSITIVO:** dos líneas indican resultado positivo. Independientemente de la intensidad del color, la HCG se halla presente en la muestra y su concentración es superior a 25 UI/l.
- **SENSIBILIDAD:** 25 mUI/l. ----- Tiempo de reacción: 5 minutos.



### **3.- Método inmunoenzimático (visual directo)**

El ensayo es inmunoenzimático "Sandwich" para GCH, combinando anticuerpos policlonales y monoclonales para una identificación selectiva y de elevada sensibilidad.

Dentro de los pocillos sensibilizados (anti-HCG policlona) se agrega la muestra y la Enzima - Conjugado (anti-  $\beta$  HCG monoclonal).

Con la presencia de HCG se forma un complejo específico de anti-HCG policlona - HCG- anti  $\beta$  HCG monoclonal - Enzima fijado en las paredes del pocillo. Luego de eliminados los remanentes de muestra y Enzima - Conjugado, se procede a la revelación que, con un color azul, identifica la presencia del mencionado complejo.

#### **Muestra**

Suero o plasma recogido con heparina o EDTA, preferentemente fresco.

Orina: preferentemente primera orina de la mañana.

#### **Técnica**

<b>Pocillos Sensib.</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Control negativo</b>	1 gota	---	---
<b>Control positivo</b>	---	1 gota	---
<b>Muestra</b>	---	---	1 gota
<b>Enzima-Conjugado</b>	1 gota	1 gota	1 gota

-Mezclar por movimientos laterales del soporte.

-Incubar 3 minutos a temperatura ambiente.

-Eliminar el contenido de los pocillos por inversión y sacudiendo para favorecer el vaciado.

-Lavar 5 veces con Sn. Lavadora.

-Ecurrir el líquido remanente sobre papel absorbente.

<b>Pocillos Sensib.</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Rvo. A</b>	1 gota	1 gota	1 gota
<b>Rvo. B</b>	1 gota	1 gota	1 gota

-Mezclar por movimientos laterales del soporte.

Entre dos y cinco minutos de agregado el Rvo. B, comparar el color desarrollado por las muestras respecto de los Controles.

#### **Interpretación del resultado**

- **POSITIVO**: cuando un pocillo de la muestra desarrolla un color azul de igual o mayor intensidad que el Control Positivo, el resultado se interpreta como "presencia de HCG".

- **NEGATIVO**: cuando el pocillo de la muestra no desarrolla color al finalizar los cinco minutos luego de agregado el Rvo. B, el resultado se interpreta como "cantidad no detectable de HCG en la muestra".

- **SENSIBILIDAD**: 25 mUI / ml. Valores compatibles con la segunda semana de fecundación.

### **4. Inmunocromatografía en placa**

Es un inmunoensayo cromatográfico, donde la membrana se encuentra recubierta con anticuerpos de captura anti- $\alpha$  HCG en la zona de la banda de prueba y de cabra anti-ratón en la zona de la banda de control. Durante la prueba, la muestra

reacciona con las partículas de oro coloidal cubiertas con anticuerpos monoclonales de ratón anti- $\beta$  HCG. La mezcla migra por la membrana por capilaridad. Si el resultado es positivo, se formará una banda coloreada con la partícula compleja en la zona de la banda de prueba (T). La ausencia de una banda coloreada en la zona de prueba indica un resultado negativo. Como un control del procedimiento, siempre aparecerá una banda de color en la región de control (C) independientemente de la presencia de HCG en la muestra.

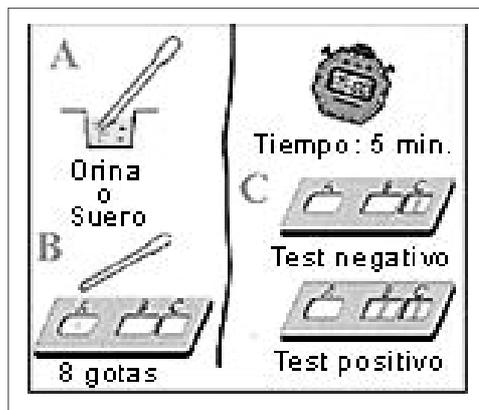
Muestra: suero u orina.

Interpretación de los resultados

- NEGATIVO: una banda de color en la zona de control (C) y ninguna banda en la zona de prueba del paciente (T).

- POSITIVO: además de la banda de control coloreada, también aparecerá una banda de color en la zona de prueba del paciente (T).

- SENSIBILIDAD: detecta concentraciones urinarias de HCG > a 20 mU/ml.



**5. Aglutinación directa**

La muestra se pone en contacto con un reactivo de látex sensibilizado con anticuerpos monoclonales anti – HCG. Si la muestra contiene HCG, esta se unirá en forma sensible y específica produciéndose una aglutinación visible macroscópicamente.

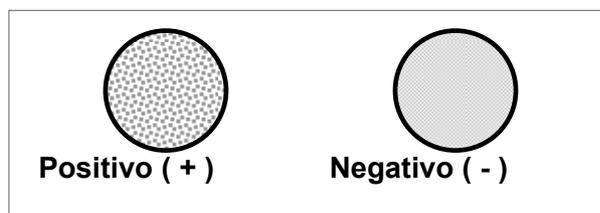
Muestra: suero u orina.

Interpretación de los resultados:

- POSITIVO: aglutinación que aparece dentro de los dos minutos.

- NEGATIVO: suspensión homogénea. Pasados los dos minutos, pueden aparecer aglutinaciones inespecíficas.

- SENSIBILIDAD: detecta HCG en orina a partir de 0,2 UI/ml.



## **BIBLIOGRAFÍA**

PESCE/ KAPLAN: *Química Clínica. Métodos*. Editorial Médica Panamericana, 1990; 497-519.

JARA ALBARRAN, A.: *Endocrinología*. Editorial Panamericana, 2001; 33-35.

GREESPON, F.; BAXTER, J.: *Endocrinología Básica y Clínica*. Editorial Manual Moderno, 1995; 611-658.

FARRERAS-ROZMAN.: *Medicina Interna*. Editorial Doyma, 12° Edición, 1992; 2136-2137.

WEST, JOHN B.: *Bases Fisiológicas de la Práctica Médica*. Editorial Panamericana, 1985; 1065-1099.

## TRABAJO PRÁCTICO N° 9 HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO

### Determinación precoz de la Hormona Estimulante de Tiroides (TSH) neonatal

#### **INTRODUCCIÓN**

La determinación precoz de TSH neonatal forma parte del sistema de *screening* neonatal junto con la de fenilalanina y tripsina. Se utiliza para la detección de Hipotiroidismo congénito.

La TSH es responsable del estímulo primario para la síntesis y secreción de las hormonas tiroxina (T4) y triiodotironina (T3); este proceso, siempre regulado por *feedback* negativo, por lo que el cuadro hormonal a encontrar en un neonato afectado sería: TSH aumentada, T4 y T3 disminuida.

Después del parto, normalmente la TSH se incrementa con rapidez hasta alcanzar un máximo a los 30 minutos, y regresa a su valor inicial en un lapso de 48 horas; se cree que este incremento neonatal de TSH es producido por la exposición al frío cuando el feto emerge al medio extrauterino.

#### **OBJETIVOS**

- Adquirir destreza y practicidad en la extracción y manipuleo de la muestra para *screening* neonatal (sangre del talón del bebé).
- Incentivar al alumno a la formación de equipos diagnósticos interdisciplinarios a fin de lograr la mejor cobertura del paciente, dado que a través del diagnóstico y tratamiento precoz se obtiene la recuperación prácticamente total del mismo.
- Concientizar acerca de la necesidad del diagnóstico precoz de los errores del metabolismo desde el punto de vista social y económico.
- Formar criterio clínico para informar los hallazgos bioquímicos mediante la interrelación de los conocimientos adquiridos y las técnicas de determinación seleccionadas.

#### Toma de Muestra

La muestra que se utiliza es sangre del talón del bebé obtenida por punción, preferentemente con lanceta estéril como "manchas" por goteo sobre tarjetas de Guthrie, y luego de 48 a 72 horas del nacimiento para no determinar valores altos arrastrados de la madre. Es aconsejable, previa punción, aumentar la irrigación del talón del bebé por masaje o frotación vigorosa (aproximadamente 2-3 minutos), para luego impregnar la plantilla o tarjeta. Tener la precaución de que la gota sea lo suficientemente gruesa, para evitar toques sucesivos en los círculos.

Posteriormente, con un sacabocados se extraen los *spots* con la sangre.

#### Determinación inmunoenzimática de la TSH neonatal

La técnica se fundamenta en un ELISA que utiliza dos anticuerpos complementarios cuyas configuraciones están generadas contra diferentes porciones del mismo antígeno; uno de ellos está unido a la placa y el otro a la enzima, los que, en presencia del antígeno van a conformar un puente o sandwich unido a la celdilla. Luego de la eliminación, mediante los lavados, de la enzima no unida, se agrega el sustrato específico a efectos de convertir el conjugado en un compuesto coloreado, y de esta manera se lee la absorbancia a 450 nm, los resultados se extrapolan de una

gráfica realizada oportunamente con los estándares provistos por el *kit*, y que representa concentraciones de TSH (uU/ml) vs. Absorbancia.

### Técnica

1. Para cada calibrador, control y desconocido por duplicado: colocar el círculo de sangre seca en papel de filtro de 1/8" (3 mm) de diámetro en sus correspondientes celdas de la microplaca.
2. Agregar 200 ul de *buffer* de elución en cada celda.
3. Tapar la placa y mezclar bien a mano durante 30 segundos y luego incubar toda la noche a temperatura ambiente.
4. Aspirar el contenido de todas las celdas (incluyendo los círculos de la muestra).
5. Lavar tres veces con 200 ul (o 300 ul) del *buffer* de lavado y aspirar o desechar este líquido para secar la celda.
6. Agregar 100 ul del conjugado enzimático diluido (1/10), e incubar una hora a temperatura ambiente.
7. Aspirar o desechar el líquido de la celda y lavar de tres a cinco veces con *buffer* de lavado.
8. Agregar 100 ul del sustrato color (TMB) a cada celda.
9. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
10. Agregar 100 ul de solución *stopper* a cada celda.
11. Leer la absorbancia a 450 nm.

### VALORES DE REFERENCIA

- TSH en neonatos de 48 - 72 hs:.....< que 20 uU / ml.
- Un valor de TSH > 20 uU / ml, certificado a los 10 días de la primera determinación junto con T3 y T4 disminuidas, indica Hipotiroidismo congénito.

### ***BIBLIOGRAFÍA***

- GRAFF, LAURINE: *Análisis de Orina. Atlas color*. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 1983.
- COLOMBO C, M; CORNEJO E, V; RAIMANN B, E.: *Errores innatos en el metabolismo del niño*. Editorial Universitaria, Santiago, Chile, 2003.
- JARA ALBARRAN, A.: *Endocrinología*. Editorial Panamericana, 2001.
- CHIESA, A; GRUÑEIRO DE PAPURDIECK, L.: *Hiperfenilalaninemia, fisiopatología y pesquisa* Revista del Hospital de niños de Buenos Aires,. Vol. 36, 1994.

**TRABAJO PRÁCTICO Nº 10**  
**EXAMEN QUÍMICO FUNCIONAL DE LAS HECES**

---

**INTRODUCCIÓN**

El estudio funcional de heces es la prueba de rigor para comenzar todo estudio funcional, ya que nos orienta respecto a las funciones digestivas, absortivas, de secreción y excreción, señalando la búsqueda de disfunciones, tales como el estudio de síndromes malabsortivos y diarreas crónicas.

**OBJETIVOS**

- Familiarizar al alumno con las técnicas habituales utilizadas en el Laboratorio de Gastroenterología, para el estudio de síndromes malabsortivos y diarreas crónicas.
- Diagnosticar la intolerancia a la lactosa mediante técnicas muy simples como pH y determinación de Cuerpos Reductores.
- Realizar, ante la sospecha de hemorragia digestiva no visible macroscópicamente, la determinación de Sangre Oculta en materia fecal.

**1.- Prueba de Digestibilidad**

Este régimen se seguirá estrictamente durante tres días y el cuarto día se recogerá la primera deposición, que deberá ser colocada en un frasco bien limpio.

Dieta:

**DESAYUNO y MERIENDA**

Leche.....250 gr.  
Infusión.....50 cc.  
Azúcar.....20 gr.  
Pan blanco....5 gr.

**ALMUERZO**

Caldo común .....1 plato  
Carne vacuna.....125 gr.  
Puré de papas.....200 gr.  
Jalea de frutas.....25gr.  
Manteca.....25 gr.  
Té liviano.....1 taza  
Azúcar.....10 gr.  
Pan blanco.....25 gr.

**CENA**

Fideos, polenta y arroz.....120 gr.  
Huevo duro..... 1  
Pan blanco..... 25 gr.  
Carne vacuna.....125 gr  
Manteca (repartir 45 gr/día).

**Suspender** medicamentos, alcohol, frutas crudas, verduras de hojas. Si no evacua el intestino el cuarto día, continuar un día más con la dieta o en caso contrario indicar una enema con agua tibia, descartando las primeras porciones.

**Recomendaciones**

- Masticar bien los alimentos
- No mezclar orina con heces

### Técnica

- Realizar la *Observación macroscópica* de las heces.
- Homogeneizar bien la muestra con varilla de vidrio.
- Tomar dos pequeñas porciones de la misma y colocar entre p.o. y c.o., agregando a cada una de ellas 1 gota de Rvo de Lugol y Sathof, respectivamente.
- Realizar la *Observación microscópica* en 100X y 400X.

### **MODELO DE INFORME**

<b>EXAMEN QUÍMICO FUNCIONAL DE LAS HECES</b>	
DIGESTIBILIDAD.	
<i>Aspecto Macroscópico:</i>	Heces moldeadas, marrón , pH = 7 . No se observa mucus ni sangre.
<i>Aspecto Microscópico:</i>	<u>Glúcidos:</u> Escasas dextrinas.  <u>Prótidos:</u> Escasas fibras musculares semidigeridas, regulares totalmente digeridas.  <u>Lípidos:</u> Escasas grasas neutras, escasos ac. grasos y escasos jabones.

### **2.- Leucocitos en Moco Fecal**

Debido al gran número de pacientes con diarrea aguda que consultan al médico, la dificultad y el retraso de identificar a las bacterias patógenas entéricas y las limitaciones en la indicación del tratamiento, es importante reevaluar el examen de leucocitos en las deposiciones, como ayuda para el diagnóstico precoz y el tratamiento de la causa de la diarrea.

El hallazgo de leucocitos depende de la integridad de la mucosa intestinal; por lo tanto, se hallan leucocitos en las infecciones por *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* invasiva, patógenas reconocidas por penetrar en la mucosa colónica.

No se encuentran en las diarreas por enterotoxinas, viral o diarreas osmóticas.

### Muestra

Se debe tomar la muestra de deposiciones frescas o conservadas no más de 24 horas.

### Técnica

- Realizar una observación directa con Lugol o Azul de metileno, colocando en un p.o. una pequeña cantidad de mucus.
- Realizar el conteo y clasificar los elementos (optativo).

**Precauciones:** los resultados no son confiables cuando las deposiciones se secaron (en el pañal) o se contaminaron con orina. Las muestras se toman en forma directa de la deposición o por escobillado anal.



Se prepara en el momento de hacer la reacción una Sn. saturada de bencidina en ácido acético (0,1 gr de bencidina + 10 ml. de ácido acético). Agregar igual volumen de agua oxigenada más unas gotas de dilución fecal.

### RESULTADO

- **Positivo:** De (+) a (++++): coloración verde que pasa al azul intenso.
- **Negativo:** No hay cambio de color.

**Precaución:** el material debe estar muy bien lavado para evitar falsos positivos.  
Esta reacción se puede aplicar a cualquier líquido biológico.

### **BIBLIOGRAFÍA**

KALINOFF et al.: *La Clínica y el Laboratorio*. S/d.

IOVINE – SELVA: *El Laboratorio y la interpretación semiológica*. S/d.

## TRABAJO PRÁCTICO Nº 11

### SÍNDROMES DE MALABSORCIÓN

---

#### **INTRODUCCIÓN**

Esteatorrea es la pérdida de grasa por materia fecal, siendo múltiples las patologías que pueden ocasionarla. Pueden ser de origen pancreático, hepático o intestinal. La cuantificación de las grasas en materia fecal y el *clearance* de alfa 1-antitripsina son usadas para el estudio de malabsorción. La primera para el diagnóstico de esteatorrea, y la segunda contribuye al diagnóstico y monitoreo evolutivo en las enteropatías perdedoras de proteínas, principalmente en niños.

#### **OBJETIVO**

- Familiarizar al alumno con las técnicas específicas habituales utilizadas en el Laboratorio de Gastroenterología, para el estudio de patologías que cursan con síndromes malabsortivos, diarreas crónicas.

### **PRUEBA DE VAN DE KAMER**

#### **Valoración de GRASAS TOTALES EN HECES**

Esta prueba se basa en la extracción de grasas totales, saponificación con formación de jabones, hidrólisis de los mismos y valoración de los ácidos grasos liberados con Sn. de NaOH 0,1 N, usando Azul de timol como indicador.

#### ***Indicaciones***

Suministrar una dieta que contenga  Adultos: 80-100 gr grasas/día.  
Niños: 40-70 gr grasas/día.

Seguir este régimen durante seis días. Recoger toda la materia fecal de los últimos tres días, en un frasco limpio y previamente tarado. Conservar en frío.

- Suspender: medicamentos, alcohol, verduras de hoja, frutas cocidas, etc.

#### **Técnica**

**Reactivos** { Alcohol etílico de 96°  
Alcohol etílico neutro  
KOH al 33 %  
Ac. ClH al 25 %  
Éter de petróleo p.e. 35 - 60 °C  
NaOH 0,1 N  
Azul de timol al 0,2 gr% en alcohol etílico  
Alcohol amílico

Pesar 2,5 gr. de heces, colocar en un Erlenmeyer, agregar 5 ml. de KOH al 33% + 20 ml. de alcohol etílico + 2 gotas de alcohol amílico. Colocar en un condensador a reflujo, hervir exactamente 20 min., haciendo una buena refrigeración. Cumplido este tiempo retirar el Erlenmeyer y en caliente agregar 8,5 ml. de ClH al 25%. Enfriar, agregar 25 ml. de éter de petróleo, agitar vigorosamente 1 min. por lo menos

(extracción de las grasas ). Dejar separar las capas, separar 12,5 ml. de la capa etérea y colocarla en un vaso de precipitado. Dejar evaporar a temperatura ambiente, redissolver el extracto con 5 ml. de alcohol neutro. Agregar al extracto alcohólico 2 - 3 gotas del indicador Azul de timol, luego titular los ácidos grasos con NaOH 0,1 N hasta viraje al azul estable.

***Toda la técnica puede ser reducida a la mitad***

Cálculos:

$$\text{gr \%} = \frac{A \times 5,51}{5}$$

en donde:

**A:** ml. de NaOH 0,1 N gastados

**5,51:** factor de corrección

**5:** gr. de heces

Para 24 horas, dividir por tres el peso total de la materia fecal y calcular por regla de tres el valor obtenido en 24 horas.

#### VALORES DE REFERENCIA

Adultos: hasta 5 gr/24 horas

Niños: hasta 3 gr/24 horas

#### **CLEARANCE DE ALFA-1 ANTITRIPSINA EN MATERIA FECAL**

El **clearance fecal de alfa-1 AT** plasmática se lo utiliza para determinar la pérdida proteica en la luz intestinal. Es un método muy útil en el estudio de pacientes con diarrea crónica, malabsorción, hipoalbuminemia de causa no conocida, y para el monitoreo de pacientes con una enteropatía perdedora de proteínas.

Muestra: materia fecal de 24 horas

Metodo: IDR

Técnica

La determinación de alfa 1-Antitripsina se efectúa por inmunodifusión radial. Tanto el suero como la materia fecal se los conserva a  $-20^{\circ}\text{C}$  si no se los procesa inmediatamente. Se realiza una dilución 1/4 de materia fecal en solución fisiológica que se agita 60 minutos y se centrifuga a 1500 rpm durante 20 minutos. Se siembran 5 ul de suero fresco y en otro pocillo la solución de materia fecal varias veces, que deberán ser consideradas en el cálculo final al igual que la dilución inicial de materia fecal.

El **clearance** de Alfa-1 AT se calcula multiplicando el peso diario de materia fecal (g/día) por la concentración fecal de alfa 1-AT (mg/g) y dividiendo este producto por la concentración sérica de la proteína(mg/dl).

$$\text{Clearance} = \text{ml suero/ día} = \frac{Q \times F \times 100}{S}$$

#### VALORES DE REFERENCIA:

**Clearance** intestinal de Alfa 1-AT = hasta 16 ml / día

Alfa 1-AT en materia fecal: hasta 100 mg%

## **BIBLIOGRAFÍA**

KALINOFF et al.: *La Clínica y el Laboratorio*. (S/d)

IOVINE – SELVA: *El Laboratorio y la interpretación semiológica*. (S/d)

MACRI C. ; BERTELEGGNI S.: *Fibrosis Quística (Mucoviscidosis)*. *Avances en Diagnóstico y Tratamiento*. Cap.III. Revista del Hptal. Niños de Buenos Aires. Supl. N° 166, 1.996, Vol. 38: S11-S13.

NAVARRO COLÁS S. et al.: *Fibrosis Quística*. "*Medicina Interna*". FARRERAS ROZMAN. Barcelona, España, Editorial Doima, 1.996, Vol. I: 218-219.

**TRABAJO PRÁCTICO Nº 12**  
**DETERMINACIÓN DE TRIPSINA INMUNORREACTIVA (TIR)**  
**EN PESQUISA NEONATAL**

---

### **INTRODUCCIÓN**

La TIR es una prueba enzimo-inmunológica (ELISA) utilizada para el diagnóstico precoz de Fibrosis Quística (FQ) a partir de un programa de pesquisa, rastreo o *screening* neonatal. La FQ es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva que afecta la región q31-32 del brazo corto del cromosoma 7 y produce la disfunción de la proteína reguladora de la conductancia transmembrana (CFTR) afectando, por tanto, a las glándulas de secreción externa del organismo, en forma polifacética a distintos órganos, principalmente páncreas y pulmón, y al transporte electrolítico debido a un bloqueo a nivel del canal del cloro produciendo una alteración en la composición de las secreciones epiteliales (sudor salado).

La determinación de TIR se basa en la medición del tripsinógeno inmunorreactivo precursor pancreático de la tripsina, cuya concentración está hasta 10 veces elevada en el recién nacido, respecto a los normales. La extracción de la muestra se hace mediante la técnica de Guthrie dentro de la primera semana de vida (óptimo: 24-72 horas de vida). El daño pancreático in-útero lleva a la liberación de tripsina con niveles elevados en circulación; sin embargo, debe destacarse que estos niveles descienden pasados los dos meses del nacimiento.

### **OBJETIVOS**

- Adquirir destreza y practicidad en la extracción y manipuleo de la muestra para *screening* neonatal (sangre del talón del bebé).
- Incentivar al alumno a la formación de equipos diagnósticos interdisciplinarios a fin de lograr la mejor cobertura del paciente, dado que a través del diagnóstico y tratamiento precoz se obtiene la recuperación prácticamente total del mismo.
- Concientizar acerca de la necesidad del diagnóstico precoz de los errores del metabolismo desde el punto de vista social y económico.
- Formar criterio clínico para informar los hallazgos bioquímicos mediante la interrelación de los conocimientos adquiridos y las técnicas de determinación seleccionadas.

### Técnica

1. Cortar con sacabocados un círculo de 3mm (1/8") de la mancha de sangre contenida en la tarjeta de Guthrie y colocarlo en el correspondiente pocillo para cada calibrador, control y desconocido.
2. Agregar 200 ul de *buffer* eluyente a cada celda.
3. Cubrir la placa, agitar a mano suavemente durante 30 seg, e incubar toda la noche a temperatura ambiente.
4. Aspirar el contenido de los pocillos. Lavar tres veces con 200 ó 300 ul de *buffer* de lavado (diluido 10 veces con agua destilada), descartar el contenido con un golpe rápido después de cada lavado.
5. Adicionar 100 ul de enzima-conjugado a cada pocillo.
6. Cubrir la placa, mezclar suavemente a mano durante 30 segundos, incubar 1 hora a °T ambiente.
7. Aspirar el contenido de los pocillos. Lavar tres veces con 200 ó 300 ul de *buffer* de lavado (diluido 10 veces con agua destilada), descartar el contenido con un golpe rápido después de cada lavado.

8. Agregar 100 ul de sustrato fresco a cada pocillo e incubar 15 minutos a °T ambiente.
9. Agregar 100 ul de solución de detención (*stopper*) a cada pocillo, agitar 10 segundos a mano horizontalmente.
10. Leer la absorbancia a 450 nm y graficar en papel semilogarítmico (absorbancia vs. Conc. en nm/ml). La reacción es estable hasta un tiempo máximo de 60 minutos.

### VALORES DE REFERENCIA

Neonatos (0-3 días): hasta 204 ngr/ml.  
 Nivel de alerta (0-3 días): mayor a 250 ngr/ml.  
 Adultos: 34-81 ngr/ml en ayunas.

SENSIBILIDAD DEL MÉTODO\*: menor a 5 ngr/ml.  
 \*IMMUCHEN NEONATAL TRIPSINA- MW ELISA

### **TEST DEL SUDOR (Método de Gibson y Cooke)**

El test del sudor es una técnica simple que se utiliza para el diagnóstico de Fibrosis Quística, patología grave que también cursa con trastornos respiratorios.

#### ***Procedimiento***

- Preparación del Paciente

-El paciente debe concurrir al laboratorio bien hidratado, no en ayunas, preferentemente con una comida líquida (desayuno o merienda).

-Debe llevar abrigo adicional para ponerse durante la realización de la prueba.

-Debe concurrir al Laboratorio con líquido para beber (agua, té, leche, café, etc.) para favorecer la transpiración.

- Preparación del material

-Disponer de agua bi o tri destilada de buena calidad.

-Gasas cortadas de 10 x 10 cm (dobles o triples) y de 1 x 1 cm (dobles o triples), bien lavadas con agua bi o tri destilada y secadas en estufa a 37°C (Las aguas de lavado serán chequeadas con el reactivo para determinar cloruros).

-Frasquitos plásticos o de vidrio (vol. aprox. 10 ml) con tapas de cierre hermético, lavados con agua bi o tri destilada.

-Bandas plásticas de 20 x 8 cm. lavadas con agua bi o tri destilada y secas.

-Guardar los materiales lavados en compartimientos individuales (tapers) y deberán se manipulados con pinzas metálicas o de plástico (nunca con las manos).

- Equipo necesario

- Aparato de iontoforesis corporal, para realizar la estimulación con pilocarpina llegando hasta 4 -5 mA, con salidas (+) y (-).

- Placas de plomo de 3 x 3 cm con pestaña que permita "prender" las salidas (+) y (-) (si no las tenés, mandalas a hacer con un plomero).

- Bandas de goma de 20 x 3 cm (para sostener las placas de plomo en el antebrazo, como pulseras).

- Bureta de 2 ml calibrada al 0,01 ml para la titulación de cloruros.

- Fotómetro de llama para valoración del sodio.

- Balanza de precisión.

- Reactivos necesarios
  - Pilocarpina hidroclohídrica preferentemente de Sigma (64 mg%) preparada en agua bidestilada.
  - Solución de Ácido Sulfúrico 0,02N ( 0,196 ml de Ac.Sulfúrico y llevar a 100 ml con agua bidestilada.)
- Soluciones para la titulación de cloruros
- (Método de Schales-Schales – Método de referencia para la valoración de cloruros)
  - Preparar una solución de patrón de ClNa 0,005N, a partir de una Solución Madre 0,5N.
  - Solución de  $(\text{NO}_3)_2\text{Hg}$  0,005N (0,8116 gr de  $(\text{NO}_3)_2\text{Hg}$  disolver en unos ml de agua bi o tri destilada y 3 ml de  $\text{NO}_3\text{H}$  conc y luego llevar a 1 lt).
  - Solución de Ácido Nítrico 2 N (12,8 ml llevar a 100 ml con agua bi o tri destilada).
  - Solución indicadora (S-difenilcarbazona) al 0,2% en alcohol común.
- Procedimiento para la obtención de la muestra

-Embeber un trozo de gasa limpio en la solución de pilocarpina y aplicarlo en el antebrazo del paciente (en la cara interna) en la zona próxima a la mano.

-Colocar sobre la gasa una plaquita de plomo (cuidar que no toque ninguna porción de piel, ni que el espesor de las gasas sea demasiado delgado para evitar quemaduras).

-Conectar la placa de plomo a la salida positiva (cable rojo) del equipo de iontoforesis.

-Proceder de forma similar con la solución de Ac. Sulfúrico, pero efectuando la aplicación unos centímetros más arriba de la pilocarpina (en el mismo brazo), conectando la placa al polo negativo (cable negro).

-Aplicar entre 4 y 5 mA durante cinco minutos, utilizando unos 45 segundos para llegar a dicha intensidad de corriente y otros 45 segundos al final, para disminuir la corriente.

-Una vez realizada la estimulación con la solución de pilocarpina, quitar las terminales, placas de plomo, gasas, y lavar muy bien la zona estimulada, con abundante agua bidestilada.

-Una vez lavada, secar muy bien con las gasas que fueron preparadas para tal fin (libres de cloro y sodio).

-Pre-pesar un trocito de gasa limpio y seco (las de 1x1 cm) en uno de los frascos de plástico.

-Luego colocar en la zona estimulada (ya limpia y seca) la gasa pre-pesada y envolver con la banda de plástico y sellar con tela adhesiva (utilizar las de tela, no las de papel).

-Dejar la gasa colocada por espacio de 45 minutos, lapso en el que el paciente, dependiendo de la edad, deberá mantener actividad física regular, caminar, subir y bajar escaleras, etc., y tomar abundante cantidad de líquido. Se debe abrigo al paciente durante este período.

-Una vez cumplido el tiempo de recolección del sudor, retirar la gasa con cuidado, depositarla nuevamente en el frasco plástico y proceder a la pesada, para calcular la cantidad de sudor recolectada.

**Peso de la muestra de sudor = Peso final de la gasa en el frasco – Pre-pesada del frasco con la gasa**

Volúmenes recogidos adecuados: (equivalentes al peso)

Peso del sudor menores de 0,050g \*

Peso del sudor entre 0,050 - 0,100g \*\*

Peso del sudor superior a 0,100g \*\*\*

• Procedimiento para la titulación de cloruros por el método de Schales- Schales

1) *Titulación de la solución de  $(NO_3)_2Hg$  con la Solución patrón de ClNa (0,005N).*

-En un frasquito perfectamente lavado con agua bi o tri destilada y perfectamente seco, colocar 1 ml de solución patrón de ClNa.

-Agregar 3 gotas de indicador (S-Difenilcarbazona) y 1 gota de Ac. Nítrico.

-Titular con la solución de  $(NO_3)_2Hg$  gota a gota hasta viraje de la solución a color liláceo claro, utilizando para ello la bureta de 2 ml.

Factor de corrección para la titulación de cloruros con solución de Nitrato mercúrico 0,005N utilizando patrón de ClNa 0,005N.

$$Factor = \frac{1 \text{ ml} \times 0,005N}{\text{Vol. de } (NO_3)_2Hg \text{ gastados (ml)}}$$

2) *Titulación de cloruros en la muestra de sudor*

-Diluir la muestra según el peso del sudor:

- Peso del sudor de **0,05 – 0,150 g**, diluir con 3 ml de agua bi o tri destilada.
- Peso del sudor **> a 0,150 g**, diluir con 5 ml de agua bi o tri destilada.

-Con una pipeta de 1 ml, lavada con agua bidestilada, homogeneizar bien el agua agregada con la gasita que contiene la muestra de sudor, tomar 1 ml de la dilución y pasarlo a otro frasco de plástico lavado con agua bidestilada y seco.

-Titular los cloruros de igual manera a como se trabajó con el patrón: a 1 ml de la dilución de sudor agregar 3 gotas de indicador, 1 gota de ácido nítrico y titular con  $(NO_3)_2Hg$  hasta viraje del indicador a color lila.

Cálculo de la Concentración de Cloruros en la Muestra

$$mEq \text{ Cl} / l = \frac{(PSR + V \text{ H}_2\text{O}) \cdot V (NO_3)_2Hg \cdot F (NO_3)_2Hg \cdot 1000}{PSR}$$

**PSR** = Peso del sudor recogido

**V H<sub>2</sub>O** = Vol. de H<sub>2</sub>O agregada a la muestra

**V (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Hg** = Vol. de Nitrato mercúrico gastado en la titulación

**F (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Hg** = Factor de corrección del nitrato mercúrico

\* Descartar

\*\* Muestra de regular cantidad

\*\*\* Muestra óptima

## VALORES DE REFERENCIA de Cloruros en sudor

**Patológico:** Valores > a 60 mEq / l.

**Sospechoso:** Valores entre 50 – 60 mEq / l, repetir la determinación; si se confirma el valor, mantener el paciente en observación como probable fibroquístico. Realizar pruebas genéticas.

**Normal:** Valores < a 50 mEq / l.

### **Cuantificación de Sodio: (Fotometría de llama)**

Debido a las concentraciones muy bajas a dosar en la muestra de sudor, es necesario preparar un patrón de sodio diferente al que se usa para el dosaje de sodio en sangre.

#### Curva de Calibración

Se debe preparar un patrón o una curva de calibración con soluciones de concentración de 0,1 a 1 mEq / l, y se construye una curva de Concentraciones (mEq / l) Vs. Lectura (%).

Del resto de la muestra diluida, que queda luego de la titulación de cloruros, tomar 0,25 y 0,5 ml y llevarlos a 1 ml con agua bidestilada a fin de obtener diluciones de ¼ y ½ respectivamente.

Leer en fotómetro de llama, llevando a 0 con agua destilada y a 100 con el patrón que corresponde a la concentración de 1 mEq/l. (Se recomienda medir antes, dos puntos diferentes de la curva para redefinirla, cada vez que se efectúa una medición).

Una vez leídas las dos diluciones de sudor, entrar a la curva y calcular la concentración; el valor hallado multiplicar por la dilución efectuada (4 y 2). Promediar y hacer los cálculos de acuerdo con la dilución inicial de la muestra (con 3 o 5 ml).

$$mEq. Na / l = \frac{[Dil (4 - 2)] \cdot CC \cdot (V H_2O + PM)}{PM}$$

**CC** = Concentración obtenida de curva

**V H<sub>2</sub>O** = Vol. agua agregado

**PM** = Peso de muestra

-Promediar los valores de ambas diluciones.

## VALORES DE REFERENCIA en Sodio

**Patológico:** Valores > a 60 mEq/l

**Sospechoso:** Valores entre 50-60 mEq/l, repetir la determinación, si se confirma el valor, mantener al paciente en observación como probable fibroquístico. Realizar pruebas genéticas.

**Normal:** Valores < a 50 mEq/l.

***ANEXO***

