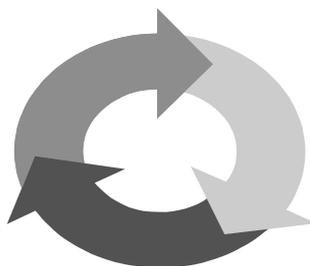


UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES

**CÁTEDRA DE BIOQUÍMICA
CLÍNICA III**

**Guía de Trabajos Prácticos
2009**



María M. Tibolla
Nora G. Márquez
Marcela Guastavino
Carolina L. Zacharzewski

Colaborador
Álvaro Errasti



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

Coordinación de la edición: Claudio Oscar Zalazar

Armado de interiores: Amelia E. Morgenstern

Corrección: Amelia E. Morgenstern

ISBN 978-950-579-135-4

Impreso en Argentina

©Editorial Universitaria

Tibolla, María Marinela

Guía de trabajos prácticos: Cátedra Clínica III. 1a ed.

Posadas: EDUNaM - Editorial Universitaria de la Universidad Nacional de Misiones, 2009.

64 p.; 30x21 cm.

ISBN 978-950-579-135-4

1. Medicina. 2. Análisis Clínicos. I. Título

CDD 616.075 61

Fecha de catalogación: 09/06/2009.

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.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| T.P. Nº 1: PARTE I: ORINA COMPLETA | 11 |
| PARTE II: HEMATURIA | 16 |
| T.P. Nº 2: DETERMINACIÓN PRECOZ DE FENILALANINA..... | 18 |
| T.P. Nº 3: LITIASIS – CALCIO – FÓSFORO – MAGNESIO..... | 21 |
| T.P. Nº 4: PROTEINURIA - UROPROTEINOGRAMA - MICROALBUMINURIA | 27 |
| T.P. Nº 5: ESTUDIO DEL FUNCIONAMIENTO RENAL: D.C.E. | 31 |
| T.P. Nº 6: LCR /LÍQUIDOS DE PUNCIÓN/LÍQUIDO SINOVIAL | 33 |
| T.P. Nº 7: ESPERMOGRAMA..... | 38 |
| T.P. Nº 8: GONADOTROFINA CORIONICA HUMANA..... | 43 |
| T.P. Nº 9: DETERMINACIÓN PRECOZ DE LA HORMONA ESTIMULANTE DE TIROIDES (TSH) NEONATAL | 48 |
| T.P. Nº 10: EX. QUÍMICO FUNCIONAL DE LAS HECES | 50 |
| T.P. Nº 11: SÍNDROMES DE MALA ABSORCIÓN | 54 |
| PRUEBA DE VAN DE KAMER CLEARANCE DE A ₁ ANTITRIPSINA | |
| T.P. Nº 12: FIBROSIS QUÍSTICA | 57 |
| DETERMINACIÓN DE TRIPSINA INMUNORREACTIVA (TIR) EN SCREENING NEONATAL TEST DEL SUDOR. | |

PROGRAMA DE BIOQUÍMICA - CLÍNICA III.

AÑO 2007

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 hidroelectrolítico. 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:

LIQUIDO 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 BIOQUÍMICO 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 asociada a Síndromes de Malabsorción: Diarreas; Enfermedad celíaca; Fibrosis quística Valoración. Indicadores

TRABAJO PRÁCTICO 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, así como 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

| | DENSIDAD |
|----------------------|-----------------|
| RN pretermino | 1003 - 1005 |
| RN termino | 1005 - 1010 |
| Lactantes | 1010 – 1020 |
| Adultos | > 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:

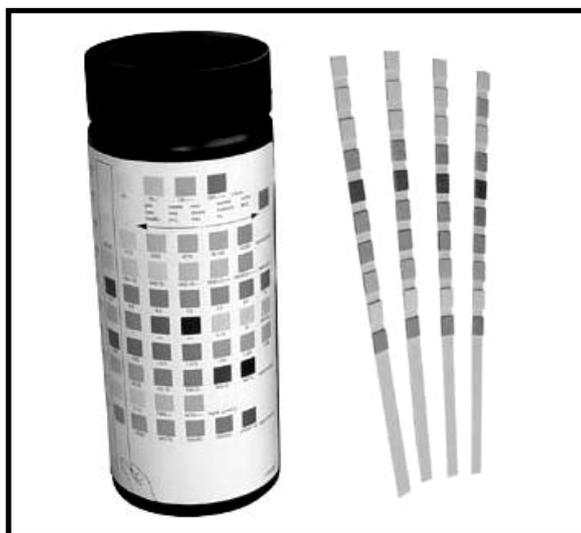
Uso de tiras reactivas: se basa en la actividad pseudoperoxidásica de la hemoglobina de la mioglobina que catalizan la oxidación del indicador cromático mediante un hidroperóxido orgánico generando un colorante azul - verdoso que, sobre el sector reactivo amarillo produce un viraje cromático, hacia el 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 K15 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 agregar 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:

| | | | | | |
|------------------------------|---|---|------------------------------|---|--|
| - Cristales de Orinas ácidas | { | Uratos amorfos (Ca, Mg, K) Uratos de sodio, amonio. Ac. úrico Oxalato de Ca Biurato de amonio | <u>Cristales 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:

MODELO DE INFORME: ANÁLISIS DE ORINA COMPLETA:

| | |
|---|--------------------------|
| Nombre del paciente: | Fecha: ../../.. |
| EXAMEN FÍSICO: | - EXAMEN QUÍMICO: |
| Color: | Proteínas: |
| Aspecto: | Glucosa: |
| Olor: | Cuerpos cetónicos: |
| Sed. Macroscópico: | Urobilinógeno: |
| Espuma: | Bilirrubina: |
| Densidad: | Hemoglobina: |
| Reacción pH: | |
| - EXAMEN DEL SEDIMENTO MICROSCÓPICO: | |
| 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 dependen 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 10 ml 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:

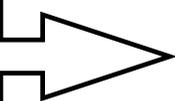
Morfología de los glóbulos rojos urinarios por contraste de fase:

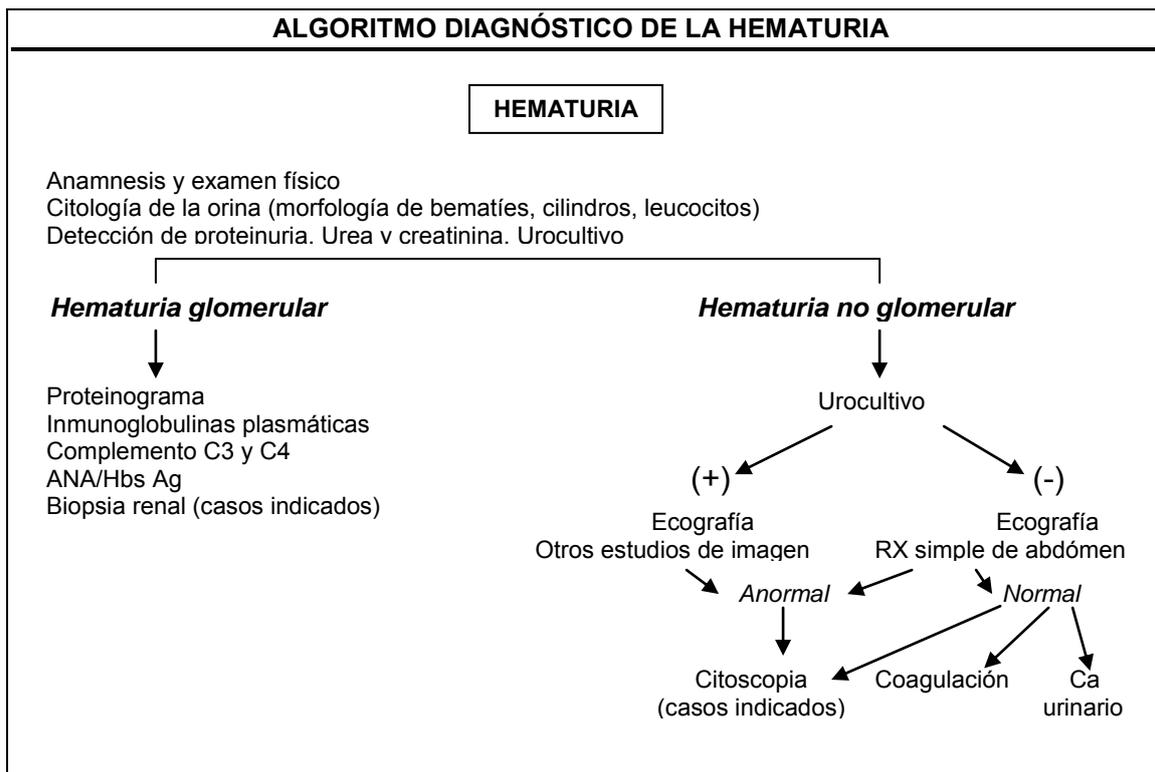
GR eumórficos: %

GR dismórficos: %

{ % Espiculados
% No espiculados
% Acantocitos

VALORES DE REFERENCIA:

| | | |
|-------------------------------------|---|--|
| GR dismórficos > 70 - 80% |  | Sugieren origen glomerular de la hematuria. |
| Acantocitos > 4 - 5 % | | |

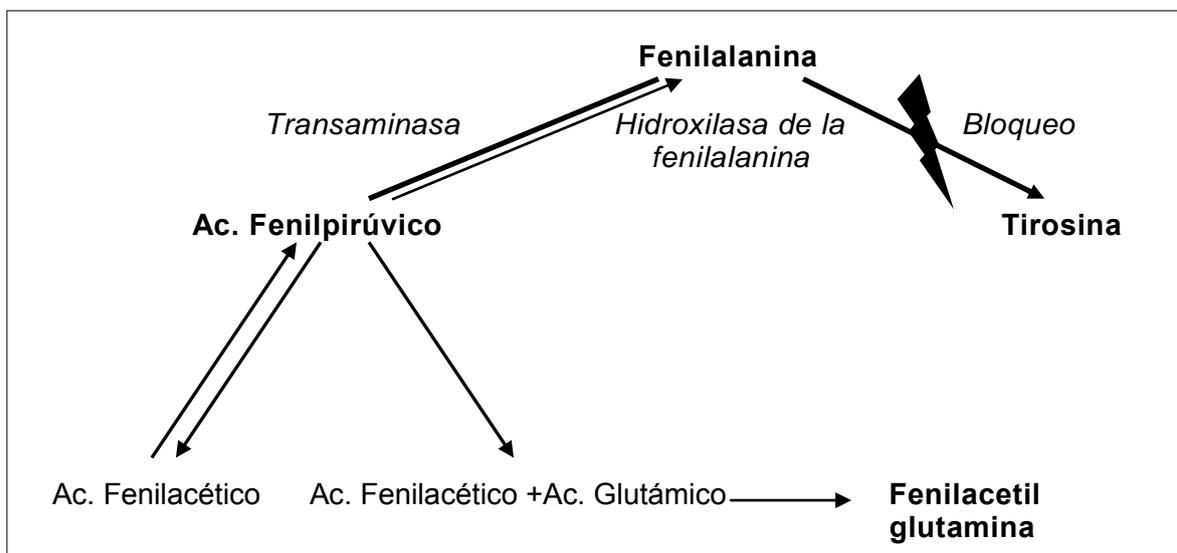


TRABAJO PRÁCTICO N° 2: DETERMINACIÓN PRECOZ DE FENILALANINA

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). Los mismos se realizan 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 o 2 días, elevándose entre 1-6 sem. los niveles urinarios de Ac. Fenilpiruvico. La prueba de detección se hace en sangre, siempre que el niño haya sido alimentado con leche durante por lo menos 24 hs.



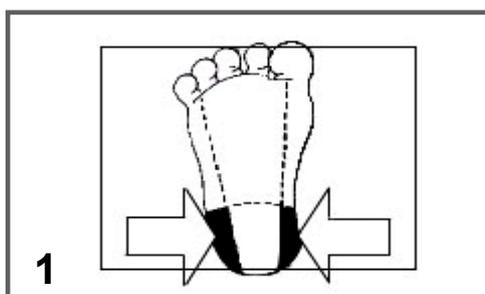
OBJETIVOS

- Adquirir destreza y practicidad en la extracción y manipuleo de la muestra para screening neonatal (sangre de 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 obtienen 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.

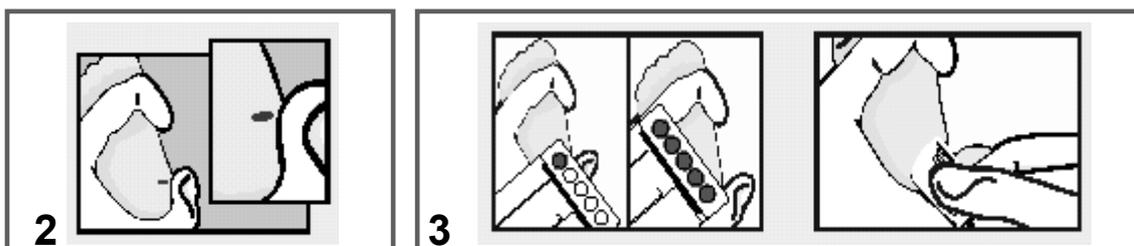
Toma de Muestra:

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 hs 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.

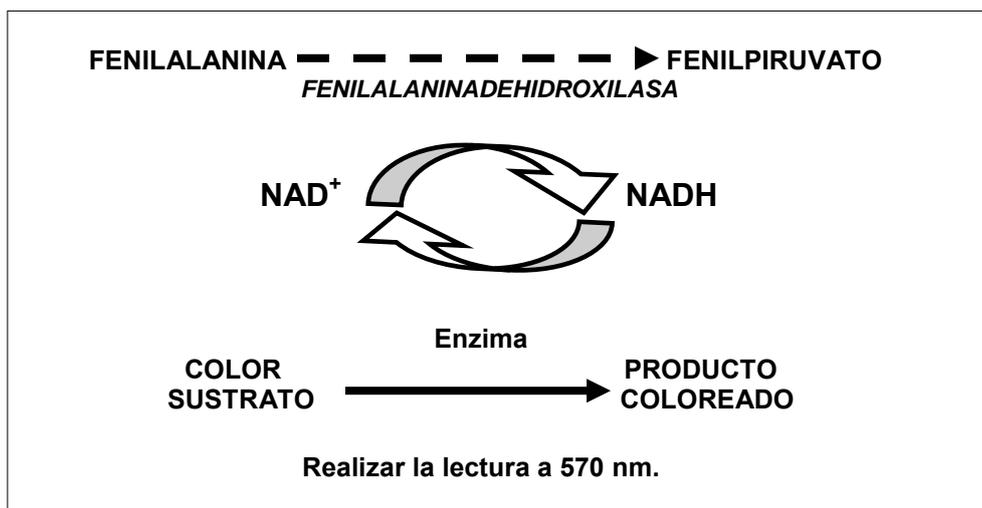


Usando una lanceta hacer la punción.

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 min a temperatura ambiente (TA).
 4. Transferir cada extracto a otro pocillo correspondientemente rotulado en una nueva paca 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 min.

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 de las causas que los han formado.
- Permitir clasificar a los cálculos según sea 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 ₂) | 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 Mezclar con palillo. | Esperar 2 a 3 min. | Color rojo frambuesa o precip. rojo frambuesa | color amarillo o anaranjado |
|--|-----------------------|--|--------------------------------|

FOSFATO

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

AMONIO

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

ÁCIDO ÚRICO

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

CISTINA

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

CALCIO

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

OXALATO

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

CALCIO

Determinación de Calcio sérico y urinario

Su concentración en suero y orina está regulada por la acción de factores tales como niveles de PTH, vit. D y Fósforo, observándose fluctuaciones fisiológicas debidas a edad, sexo, embarazo, actividad física, cambios estacionales (por acción de la luz solar).

Fundamentos del método:

El calcio reacciona con la o-cresolftalein complexona (o-CPC) a pH 10.8, dando un complejo de color magenta que se mide fotocolorimetricamente a 670 nm.

Técnica:

| | Blanco | | |
|---------------------------------|---------------|-------|-------|
| Agua destilada | 50 ul | - | - |
| Standard | - | 50 ul | - |
| Muestra | - | - | 50 ul |
| Rvo. Único (premezclado) | 2 ml | 2 ml | 2 ml |

Mezclar, incubar 5 min. a Temp. amb. y leer la absorbancia en espectrofotómetro a 570 nm.

Calculo de los resultados

$$1) \text{ Calcio sérico (mg/dl)} = D \times f \quad f = 10 \text{ mg/dl} / S$$

$$2) \text{ Calcio urinario (mg/24 hs)} = D/S \times 200 \text{ mg/24 hs.}$$

Valores de Referencia:

Suero: 8.5 – 10.5 mg/dl

Orina: hasta 300 mg/24 hs. (para una dieta normal)

FÓSFORO

El fósforo es constituyente esencial de los tejidos óseos y muscular, y su concentración en circulación está regulada entre otros factores por los niveles de vit. D y las glándulas endocrinas, observándose variaciones fisiológicas de acuerdo a la edad, ingesta, actividad física, embarazo, etc.

Fundamentos del método:

El fosfato inorgánico reacciona en medio ácido con el molibdato para dar fosfomolibdato, que es reducido por el ácido ascórbico a azul de molibdeno, desarrollándose el color en medio arsenito/citrato. El arsenito/citrato se combina con el exceso de molibdato impidiendo su reacción posterior con el fosfato liberado de los esteres lábiles. El color obtenido se mide entre 620 – 650 nm.

Técnica:

| | Blanco | | |
|-----------------|---------------|-------|-------|
| Standard | - | 20 ul | - |
| Muestra | - | - | 20 ul |
| Rvo. 1 | 1 ml | 1 ml | 1 ml |

Mezclar por agitación suave. Esperar por lo menos 30 seg. Y no más de 2 min. y luego agregar:

| | | | |
|---------------|--|--|--|
| Rvo. 2 | | | |
|---------------|--|--|--|

Mezclar. Esperar por lo menos 30 seg. Y no más de 2 min. luego agregar:

| | | | |
|---------------|--------|--------|--------|
| Rvo. 3 | 1.5 ml | 1.5 ml | 1.5 ml |
|---------------|--------|--------|--------|

Mezclar por inversión. A los 10 min. retirar del baño y leer en espectrofotómetro entre 620 – 650 nm.

Calculo de los resultados:

1) Suero o plasma

$$P_i \text{ (mg/dl)} = D/S \times 4 \text{ mg/dl}$$

2) Orina

$$P_i \text{ (g/24 hs)} = D/S \times 0.4 \text{ g/24 hs.}$$

Valores de Referencia:

Suero:

Adultos: 2.50 – 4.50 mg/dl

Niños: 4.00 – 6.50 mg/dl

Orina:

0.34 – 1.00 g/24 hs.

MAGNESIO

El Mg es un ión muy abundante en el organismo donde el 60% se halla en hueso y el resto en tejidos blandos. Participa en el metabolismo energético activando el ATP, en la transferencia de fosfatos de alta energía y es activador de enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos, carbohidratos y proteínas. Y es mediador en mecanismos de conducción y transporte transmemembranas, entre otras funciones. Sus variaciones fisiológicas están asociadas a otros iones debiéndose su disminución (hipomagnesemia) a múltiples causas como diarreas crónicas y agudas, síndromes de malabsorción, deterioro de la función renal, diabetes, etc.

Fundamento del método

El Mg en medio alcalino reacciona con el xilidyl blue, formando un complejo color púrpura cuya intensidad es proporcional a la concentración de Mg presente en la muestra. La incorporación de un complejante EGTA al reactivo elimina los iones calcio interferentes.

Muestra:

Orina de 24 hs acidificada con HCl concentrado hasta pH 3-4.

Técnica:

| | Blanco | Standard | Desconocido |
|-----------------------|---------------|-----------------|--------------------|
| Agua destilada | 10 ul | - | - |
| Standard | - | 10 ul | - |
| Muestra | - | - | 10 ul |
| Rvo. Color | 1 ml | 1 ml | 1 ml |

Mezclar, incubar 5 min. a Temp. amb. y leer la absorbancia en espectrofotómetro a 510 nm.

Calculo de los resultados:

$$1) \text{ Mg urinario (mg/dl)} = D \times f \times 5 \quad f = S \text{ (mg/dl)} / S$$

$$2) \text{ Mg urinario (mg/24 hs)} = D \times f \times 5 \times V \times 10$$

5: factor de dilución

V: volumen de la diuresis en lt/24 hs

10: factor conversión de dl a lt

Valores esperados: 50 - 150 mg/24 hs (0,8 - 6,2 mmol/l)

1,0 - 10 mg/dl (0,4 - 4,1 mmol/l)

BIBLIOGRAFÍA

ZANCHETTA, J. R. BOGADO, C. E. "Litiasis". Ciencia Hoy. Vol. 1 (1). 1989.

Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

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.; GÓMEZ 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 – MICROALBUMINURIA

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 a la lesión túbulo-glomerular.
- Identificar patrones electroforéticos que nos permitirá 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 hs. 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 min. a 37°C.

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

Cálculos:

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

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

1000= mg/l del Standard.

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

VALORES DE REFERENCIA:

Orina de 24 hs: 30-140 mg/24 hs (hasta 160 mg/24 hs 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 10%/Sulfosalicílico 5%) 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 Rvo.Fe en el momento).... 3-5 min
5. Tres lavados con agua destilada..... 5 min c/u
6. Tonalización.
7. Transparentización (idem 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 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) Ácido Oxálico----- 12 gr/l

3) Cloruro Férrico----- 24 gr/l

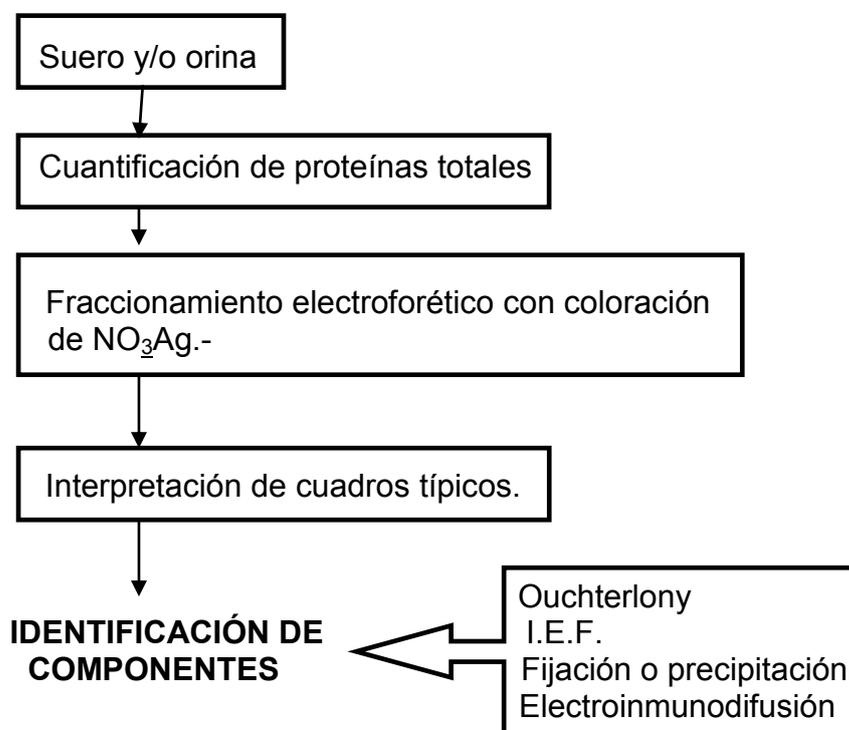
Mezclar en el momento un volumen de cada uno. El cloruro férrico produce el pasaje de Ag^+ a Ag^0 que se intercambia in situ con el ferricianuro, dando color azul (azul de Prusia) y mejorar la visualización.

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 en dicho.

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

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

MARCA DE PROTEÍNAS PARA LÍQUIDOS BIOLÓGICOS:



MICROALBUMINURIA

Se denomina microalbuminuria al aumento de excreción urinaria de albúmina por encima de niveles normales pero en ausencia de nefropatía clínica manifiesta. Se define como la excreción de 30 a 300 mg de albúmina en 24 hs. (20 - 200 ug/min) en 2 o 3 recolecciones urinarias realizadas en un periodo de pocas semanas.

Fundamentos del Método: la albúmina reacciona con el anticuerpo específico formando inmunocomplejos insolubles. La turbidez causada por estos inmunocomplejos es proporcional a la concentración de albúmina en la muestra y puede ser medida espectrofotométricamente.

Técnica:

- 1 gota muestra orina / 24 hs.- + Rvo. A (Sn. Fisiológica tamponada pH 7.6)
- Mezclar e incubar
- Leer a 340 nm
- Agregar Rvo. B (anticuerpos monoespecíficos anti-albumina humana)
- Mezclar e incubar
- Leer a 340 nm.

Dado que la reacción es no lineal, es necesario calibrar al método mediante una curva de calibración.

| Tabla 2.- Criterios de excreción urinaria de albúmina – ADA | | | |
|--|---|--|------------------------------------|
| Categoría | Orina aislada (µg Alb/mg creatinina) | Orina/4hs o nocturna (µg Alb/mg Creatinina) | Orina/24hs (mg Alb/24h) |
| Normal | < 30 | < 20 | < 30 |
| MicroAlb | 30 a 299 | 20 a 199 | 30 a 299 |
| MacroAlb | ≥ 300 | ≥ 200 | ≥ 300 |

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. 1988. España.

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

**TRABAJO PRÁCTICO N° 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 al 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:

| | S | D |
|-----------------------|----------|----------|
| Rvo.de trabajo | 1 ml. | 1 ml. |
| Standard | 0,2 ml. | ---- |
| Muestra | ---- | 0,2 ml. |

-Mezclar inmediatamente, disparando al mismo tiempo el cronómetro y proseguir la incubación. A los 30" exactos medir la absorbancia (S₁ y D₁) continuar la incubación.

Medir nuevamente la absorbancia (S_2 y D_2) a los 5 min. (4 min. 30 seg. después de la primer lectura). La medición a los 30" se realiza para eliminar los reactivos de fase rápida y consecuentemente, con la medición de los 5 min. 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 Standart .

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; 29-36. Buenos Aires. 1990.

GUYTON-LEVY. "Fisiología" Editorial Interamericana. 1997.

FARRERAS VALENTI, P.; ROZMAN, C.; DANELL, A. "Medicina Interna". Editorial Dayma. 1988. España.

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 medula espinal, contra los efectos de las ondas de presión externa. Su pH esta 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 ₂ O |
| Volumen | | 120-140 dl. |
| Densidad | | 1,003-1,008 |
| Células | Adultos | 0-5 mononucleares |
| | Infantes | 0-20 monucleares |
| Proteína total (ppalmente Albumina) | | 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 |
| Ac. 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 coagulo.**

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 / mm³
Niños menor 1 año:.....hasta 30 cel / mm³
Niños 5 años hasta pubertad:.....hasta 10 cel / mm³.

b) **Predominio celular:**

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

Ex. Químico:

a) **Proteínas:**

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

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

Reactivo: Fenol p.a. cristalizado10 gr.
agua dest.....100 ml.

Colocar en un frasco con tapa, agitar hasta emulsionar y llevar a 37°C, 2 a 3 días con agitación frecuente. Dejar reposar y utilizar la capa superior.

Técnica: En un tubo de hemólisis colocar 1 ml. del Rvo. Fenólico más 1 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 3 min.

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.

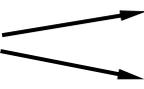
e): **Otras determinaciones:** VDRL, Toxo, subtipos de Igs, etc.

MODELO DE INFORME:

| | |
|--------------------------|--|
| - Ex. Físico: | Aspecto Color Red de fibrina Presencia de coágulo |
| - Ex. Citológico: | Recuento celular =/ mm ³ Predominio =/ mm ³ |
| - Ex. Químico: | 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 |
|----------------------|---------------------------------|---|
| Color | Amarillo claro | Variable |
| Aspecto | En gral. límpido | Seroso, purulento, hemorrágico |
| Densidad | Menor a 1,018 | Mayor a 1,018 |
| Coagulación | Ausente o muy tenue | Casi siempre presente |
| Proteínas | Menor de 3 gr/100 ml. | Mayor de 3 gr/100ml. |
| R. de Rivalta | (-) negativa | (+) positiva |
| Células | 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/ antiglicolítico  Glucosa
- tubo s/ anticoagulante  Ex. físico y químico.

| | Características Físico - Químicas |
|--|---|
| Volumen | menor a 3,5 ml. |
| Aspecto | claro, incoloro. |
| Viscosidad | alta. |
| Coagulo de fibrina | ausente. |
| Coágulo de mucina | bueno. |
| Nº de células | menor 200 / mm ³ . |
| Leucocitos PMN | menor 25%. |
| Diferencia glucosa (entre suero y sinovia). | menor 10 mg/ 100 ml. |
| Proteínas | menor 2,5 gr%. |
| LDH | diferencia entre suero y sinovia. |
| Ac. Úrico | diferencia entre suero y sinovia. |
| Factor reumatoideo | realizar simultáneamente en sangre y sinovia. |
| Complemento | ídem determinación anterior. |
| Cristales | 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"> - Urato monosódico. - Dehidrato de pirofosfato cálcico. - Colesterol. |

BIBLIOGRAFÍA:

- ADAMS, R.D., VÍCTOR, M., ROMPER, A.H. "Principios de Neurología". 6º ed. En castellano. Mc Graw Hill- Interamerican. 1999: 11-16.
- DE MYER, W. "Técnica del examen Neurológico". Texto programado 3º ed. Médica Panamericana S.A. 1982: 497- 513.
- ANDERSON- COCKAYNE. "Química Clínica" edit. Interamericana Mc Graw Hill. 1993. Philadelphia. Pennsylvania (USA).
- RINALDI, M.R.; ARDANAZ OTAÑO, S.; NOTARIO, R.D. "Líquido Cefalorraquídeo"; Edit. 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, G.R.V. "Enfermedades autoinmunes del Tej. Conectivo". Edit. 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 tres segmentos: cabeza, cuello (pieza intermedia) y cola.



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:

- a) Color: blanco amarillento, blanco grisáceo, amarillo, rojizo, etc.
- b) Aspecto: traslúcido, ligeramente opalescente, opalescente, turbio, etc.
- c) Viscosidad: Determinar la misma una vez que se ha producido la licuefacción completa a la hora.
- d) 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

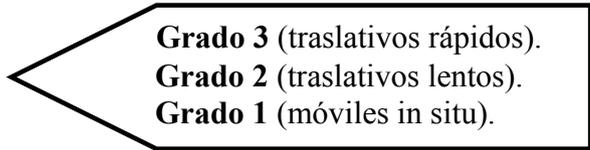
VALORES DE REFERENCIA → 7,8 - 8,2

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 %**

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):

En base a 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 dest.

- Sn de Macomber: NaCO₃ 5% en Formol 1%
agua dest.

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 mm².

80 : n° de cuadraditos contados.

10 : altura de cámara.

20 : dilución empleada en el ej. citado.

1000: para llevar de mm³ a cm³.

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 1×10^6 leucocitos.

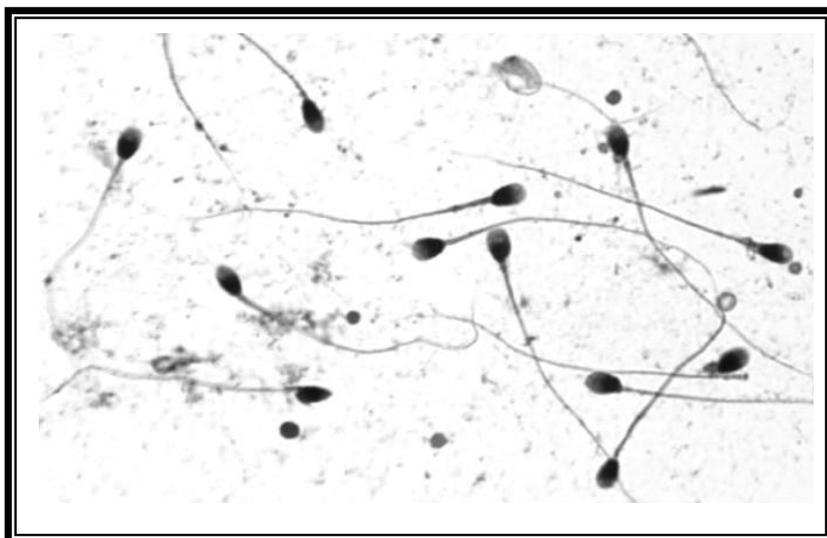
g) Fórmula espermática:

Se realiza un extendido con 20 ul de espermatozoides. Si el recuento espermático fuera bajo, deberá centrifugarse la muestra y realizar el extendido con el pelex. Dejar secar a temp. amb. 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: > 15 % de formas morfológicas normales – OMS 99

| | |
|-------------------------|------|
| % anomalías de cabeza: | ___% |
| % anomalías de cuello: | ___% |
| % anomalías de cola: | ___% |
| % gotas citoplasmáticas | ___% |



Observación microscópica de una muestra de semen (400 X)

h) Recuento diferencial:

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



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

MODELO DE INFORME:

| | |
|----------------------------------|--------------------------------------|
| ESPERMOGRAMA MORFOLÓGICO: | |
| <u>EXAMEN MACROSCÓPICO:</u> | Color..... |
| | Aspecto..... |
| | Viscosidad..... |
| | Volumen.....ml |
| | pH..... |
| <u>EXAMEN MICROSCÓPICO:</u> | 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 min. 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 ác. cítrico forma un compuesto de condensación con la piridina de color amarillo.-

VALORES DE REFERENCIA → 350 -- 670 mg%.

c) 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 da la próstata.

VALORES DE REFERENCIA → > 20 mU / eyaculado

PLASMA SEMINAL:

Determinaciones químicas:

- a) Fructosa.....mg%
- b) Ac. Cítrico.....mg%
- c) α glucosidasamU/eyac.

BIBLIOGRAFÍA:

CALAMERA, J.C.; BRUGO OLMEDO, S. “Manual de Prácticas de Laboratorio en Reproducción Humana”. Buenos Aires Edita SA. 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”. Edit. Panamericana. 1992.

CALAMERA, J.C. “Morfología espermática para todos”. Ediciones Científicas

TRABAJOS PRÁCTICOS N° 8 GONADOTROFINA CORIONICA HUMANA (GCH).

INTRODUCCIÓN:

La GCH es una glucoproteína compuesta por 2 cadenas polipeptídicas α y β , cuya especificidad biológica está determinada por los 30 aminoácidos carboxilo-terminales de la subunidad β . 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 cel. 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 a 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- β que no han sido bloqueados. Muestra: orina, preferentemente la primera de la mañana.

Técnica:

En cada sección de la placa colocar:

Muestra.....1 gota

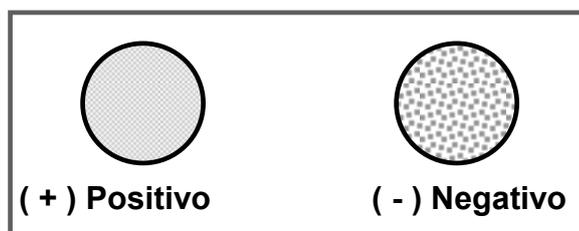
Rvo. Anti-HCG- β1 gota

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 min. de reacción.-



Interpretación del resultado:

- **POSITIVO.** No aglutinación. La suspensión se mantiene homogénea dentro de los 2 min. 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 min. 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 seg., 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 3 min.

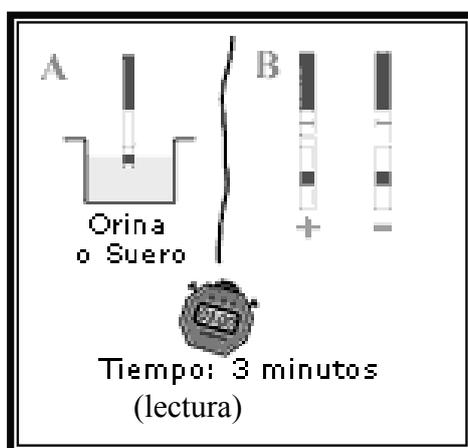
Interpretación del resultado:

- **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 min.



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 policlonal) se agrega la muestra y la Enzima - Conjugado (anti- β HCG monoclonal).

Con la presencia de HCG, se forma un complejo específico de anti-HCG policlonal - HCG- anti β 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:

| Pocillos Sensib. | 1 | 2 | 3 |
|-------------------------|----------|----------|----------|
| Control negativo | 1 gota | --- | --- |
| Control positivo | --- | 1 gota | --- |
| Muestra | --- | --- | 1 gota |
| Enzima-Conjugado | 1 gota | 1 gota | 1 gota |

-Mezclar por movimientos laterales del soporte.

-Incubar 3 min. a temp. amb.

-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.

| Pocillos Sensib. | 1 | 2 | 3 |
|-------------------------|----------|----------|----------|
| Rvo. A | 1 gota | 1 gota | 1 gota |
| Rvo. B | 1 gota | 1 gota | 1 gota |

-Mezclar por movimientos laterales del soporte.

Entre el 2 y 5 min. 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 5 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- α 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- β 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.

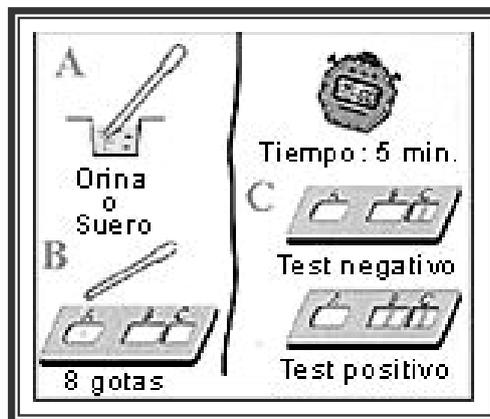
Muestra: suero u orina.

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.

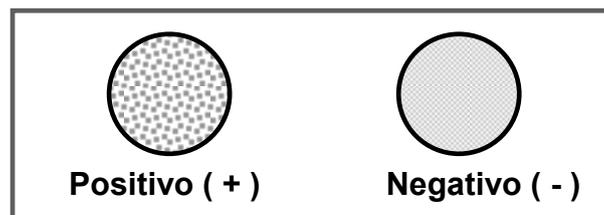
Muestra: suero u orina.

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". Edit. Medica Panamericana. 1990, 497-519.

JARA ALBARRAN, A. "Endocrinología". Edit. Panamericana. 2001; 33-35.

GREESPON, F.; BAXTER, J. "Endocrinología Básica y Clínica". Edit. Manual Moderno. 1995; 611-658.

FARRERAS-ROZMAN. "Medicina Interna". Edit. Doyma. 12° Ed. 1992; 2136-2137.

WEST, JOHN B. "Bases Fisiológicas de la Práctica Médica". Edit. 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 min, y regresa a su valor inicial en un lapso de 48 Hs., 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 de 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 obtienen 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 hs 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 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 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, 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 "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 3 a 5 veces con buffer de lavado.
8. Agregar 100 ul del substrato 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". Edit. Universitaria. Santiago, Chile. 2003.
- JARA ALBARRAN, A. "Endocrinología". Edit. Panamericana. 2001.
- CHIESA, A.; GRUÑEIRO DE PAPURDIECK, L. "Hiperfenilalaninemia, fisiopatología y pesquisa" Revista del Hospital de niños de Bs. As. Vm 36. 1994.

TRABAJO PRÁCTICO N° 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 Lab. 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 3 días y el 4to. 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 4to. 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 2 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

| EXAMEN QUÍMICO FUNCIONAL DE LAS HECES. | |
|---|---|
| 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 hs.

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 secan (en el pañal) o se contaminaron con orina. Las muestras se toman en forma directa de la deposición o por escobillado anal.

3.- pH y detección de Azúcares o Cuerpos Reductores:

La fermentación bacteriana en el intestino delgado se cumple en condiciones habituales, dando origen a ácidos de bajo pH. (Láctico, Acético, etc.).

La presunción clínica de una diarrea fermentativa implica certificar dicho proceso químicamente, siendo uno de los parámetros usados el pH.

Muestra:

Recoger una parte de la materia fecal en un frasco limpio y enviar al laboratorio antes de las dos horas de emitida.

pH:

Metodo → Se usa papeles indicadores de pH.

Técnica:

- Si las heces son diarreicas se homogeneiza y se toma una porción con varilla de vidrio que se aplica sobre el papel.
- Si las heces son moldeadas se le agrega un poco de agua o solución fisiológica, (tratando de ablandar sin diluir demasiado) y se procede como en el caso anterior.

VALORES DE REFERENCIA:

La reacción es neutra, por lo general es a veces ligeramente ácida o alcalina. El pH varía entre 6,9 a 7,2.

Cuerpos Reductores:

Filtrar una porción de materia fecal en un tubo de ensayo.

Agregar partes iguales de Fehling A y Fehling B (igual volumen que materia fecal).

Calentar a Baño María durante 4 min.

- **Positivo:** Vira del verde al rojo ladrillo.
- **Negativo:** Permanece el color azul.

4. Sangre oculta en materia fecal

Un análisis de sangrado oculto en la materia fecal (SOMF) es una prueba no invasiva para detectar el presencia de sangre oculta en la deposición (heces fecales). La prueba se usa para detectar el goteo de sangre dentro del intestino, normalmente, desde el estómago, hasta el recto.

Un análisis de SOMF se usa principalmente como parte del proceso de revisión de cáncer colorrectal, úlceras gastroduodenales o lesiones esofágicas de diferentes índoles.

Existen métodos basados en el proceso de oxidación que sufren ciertos compuestos fenolicos por parte del grupo del grupo hem de la sangre.

Para este tipo de análisis es necesario juntar muestra de materia fecal, previa dieta

Régimen:

Indicar 3 días la siguiente dieta y el 4to. día recoger la primera deposición.
Colocarla en un frasco bien limpio.

- No comer carne de ningún tipo (vacuna, porcina, aves ni pescado).
- No comer verduras de hoja (crudas ni cocidas).
- No comer manzanas verdes.
- No tomar medicamentos con hierro, bismuto, vit. C., etc.
- Evitar el cepillado de encías que sangran.

Si no evacúa el intestino, hacer enema con agua tibia.

Técnica:

Reacción de la Bencidina: Bencidina.....0,1 gr
 agua oxig.....30 vol.
 Ac. acético 50%.....10 ml.

Se prepara en el momento de hacer la reacción una Sn. saturada de bencidina en ac. acético (0,1 gr de bencidina + 10 ml. de ac. 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.

También existen métodos inmunológicos e inmunocromatográficos rápidos y de tipo cualitativos. Estos métodos emplean una combinación de anticuerpo monoclonal conjugado marcado y anticuerpo policlonal en fase solida para identificar selectivamente humana con un alto grado de sensibilidad y especificidad.

La técnica consiste en recoger muestra sobre una tarjeta especial, la cual se coloca en una solución de extracción y unas pocas gotas de este extracto son utilizadas para la reaccion inmunocromatografica en dispositivos preparados APRA tal fin. A medida que la muestra en ensayo corre a través del dispositivo absorbente, el conjugado anticuerpo-colorante se une al antígeno hemoglobina formando un complejo antígeno-anticuerpo. Este complejo se une al anticuerpo de hemoglobina en la zona de reacción produciendo una banda de color rosado. En ausencia de hemoglobina, no se observara línea alguna en la zona de prueba. La mezcla de reacción continúa corriendo a través del dispositivo absorbente. El conjugado libre se une a los reactivos en la zona de control produciendo una banda de color rosado, demostrando así que los reactivos funcionan correctamente.

BIBLIOGRAFÍA

KALINOFF et al. “La Clínica y el Laboratorio”.
IOVINE – SELVA. “El Laboratorio y la interpretación semiológica”.
HEM-CHECK-1. VEDALAB. FRANCIA.

TRABAJO PRÁCTICO N° 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 la enteropatías perdedoras de proteínas.

OBJETIVOS:

- Familiarizar al alumno con las técnicas específicas habituales utilizadas en el Lab. 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 ac. 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 6 días. Recoger toda la materia fecal de los últimos 3 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. CIH 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 5 gr. de heces, colocar en un erlenmeyer, agregar 10 ml. de KOH al 33% + 40 ml. de alcohol etílico + 4 gotas de alcohol amílico. Colocar en un condensador a reflujo, hervir exactamente 20 min., haciendo una buena refrigeración. Cumplido este

tiempo retirar el erlemeyer y en caliente agregar 17 ml. de CIH al 25%. Enfriar, agregar 50 ml. de éter de petróleo, agitar vigorosamente 1 min. por lo menos (extracción de las grasas). Dejar separar las capas, separar 25 ml. de la capa etérea y colocarla en un vaso de precipitado. Dejar evaporar a temp. amb., redisolver el extracto con 10 ml. de alcohol neutro. Agregar al extracto alcohólico 2 - 3 gotas del indicador Azul de timol, luego titular los ac. grasos con NaOH 0,1 N hasta viraje al azul estable.

Toda la técnica puede ser reducida a la mitad.

Cálculos:

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

en donde: **A:** ml. de NaOH 0,1 N gastados.
5,51: factor de corrección
5: gr. de heces.

Observaciones: El factor de corrección considera el PM medio de los ácidos grasos titulados (265), un factor de corrección de variaron de volumen empírico por el cambio que se produce al mezclar el éter con el alcohol (1,04) y la proporción de la capa etérea utilizada para la titulación (2).

$$265 \times 1,04 \times 2 \times 100 / 10000 = 5,5$$

Para 24 hs. dividir por 3 el peso total de la materia fecal y calcular por regla de tres el valor obtenido en 24 hs.

VALORES DE REFERENCIA:

Adultos: hasta 5 gr/24 hs.

Niños: hasta 2 gr/24 hs.

CLEARENCE 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 Hs.

Método: IDR.

Técnica:

La determinación de alfa 1-Antitripsina se efectúa por inmunodifusión radial. Tanto el suero como la materia fecal se los conservan a -20°C si no se los procesa inmediatamente. Se realiza una dilución 1 / 4 de materia fecal en solución fisiológica que se agita 60 min y se centrifuga a 1500 rpm durante 20 min. 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).

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

VALORES DE REFERENCIA:

Clearence intestinal de Alfa 1-AT = hasta 16 ml / día.

Alfa 1-AT en Mat.Fecal: hasta 100 mg%

BIBLIOGRAFIA

KALINOFF et al. "La Clínica y el Laboratorio".

IOVINE – SELVA. "El Laboratorio y la interpretación semiológica".

MACRI C Y BERTELEGGNI S. "Fibrosis Quística (Mucoviscidosis). Avances en Diagnóstico y Tratamiento". Cap.III. Rev. 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 N° 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 esta 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 primer semana de vida (optimo: 24-72 hs. 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 de 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 obtienen 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 3 veces con 200 o 300 ul de buffer de lavado (diluido 10 veces con agua destilada), descartar el contenido con un golpe rapido después de cada lavado.
5. adicionar 100 ul de enzima-conjugado a cada pocillo.
6. cubrir la placa, mezclar suavemente a mano durante 30 seg, incubar 1 hora a °T ambiente.
7. aspirar el contenido de los pocillos. Lavar 3 veces con 200 o 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 min a °T ambiente.
9. agregar 100 ul de solución de detención (stopper) a cada pocillo. agitar 10 seg 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 min.

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 METODO*: 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 diagnostico 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, mándalas 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.

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 (NO₃)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 (NO₃)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 Ac. nítrico y titular con (NO₃)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 H₂O = Vol. de H₂O agregada a la muestra

V (NO₃)₂Hg = Vol. de Nitrato mercúrico gastado en la titulación

F (NO₃)₂Hg = Factor de corrección del nitrato mercúrico

VALORES DE REFERENCIA de Cloruros en sudor:

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

* Descartar

** Muestra de regular cantidad

*** muestra óptima

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 a la dilución inicial de la muestra (con 3 o 5 ml).

$$\text{mEq. Na / l} = \frac{[\text{Dil (4 - 2)}] \cdot \text{CC} \cdot (\text{V H}_2\text{O} + \text{PM})}{\text{PM}}$$

CC = Concentración obtenida de curva.

V H₂O = 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**.

BIBLIGRAFÍA

Shales, O., Shales, S.S. J Biol Chem 1941; 140:879-81.

ANEXO

