

MANUAL DE QUÍMICA SANGUÍNEA



EMPRESA SOCIAL DEL ESTADO
HOSPITAL SAN AGUSTIN DE
FONSECA

YELITZA DEL CARMEN AYALA
REDONDO
Gerente

02-02-2020



TABLA DE CONTENIDO

1.	MÉTODO DE LA GLUCOSA OXIDASA	2
2.	DETERMINACIÓN DE COLESTEROL TOTAL	3
2.1.	MÉTODO CALORIMÉTRICO. COLESTEROL OXIDASA/PEROXIDASA.....	3
2.2.	CORRELACIÓN CLÍNICA.....	5
3.	DETERMINACIÓN DE COLESTEROL HDL	5
4.	DETERMINACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS.....	6
4.1.	MÉTODO COLORIMÉTRICO ENZIMÁTICO.....	6
5.	DETERMINACIÓN DE ACIDO URICO.....	8
5.1.	MÉTODO. URICASA / PEROXIDASA.....	8
6.	DETERMINACIÓN DE BILIRRUBINA	9
6.1.	MÉTODO	10
7.	EXPRESIÓN DE RESULTADOS	11
8.	DETERMINACIÓN DE UREA (BUN).....	11
8.1.	MÉTODO – UREASA/SALICILATO	11
9.	DETERMINACION DE CREATININA.....	13
9.1.	MÉTODO PICRATO ALCALINO	13

1. MÉTODO DE LA GLUCOSA OXIDASA

- Fundamento: La glucosa oxidasa actúa sobre la glucosa en medio acuoso y produce peróxido de hidrógeno el cual reacciona con fenol y 4 aminofenazona en presencia de la peroxidasa para dar origen a una quinoneimina coloreada que es el indicador y cuya concentración es proporcional a la concentración de la sustancia investigada.

GOD

GLUCOSA + O₂ + H₂O ----- ACIDO GLUCONICO + H₂O₂

POD

H₂O₂ + 4-AMINOFEZONA + FENOL -----QUINONEIMINA + H₂O₂

- Muestra: Suero o plasma libre de hemólisis; la muestra deberá separarse lo más pronto posible debido a que la glucosa en sangre total puede experimentar glucólisis a una velocidad de 5%. Puede conservarse la muestra hasta 3 días a temperatura de 2-8oC especialmente si se le agrega yodo acetato para inhibir la glucólisis.

- Reactivos:

- Buffer fosfatos pH 7.5
- 4- Aminofenazona
- Fenol
- Glucosa oxidasa
- Peroxidasa
- Estabilizadores

Técnica

- Longitud de onda: 520 nm
- Paso de la luz a la cubeta: 1 cm
- Temperatura: 37oC
- Lectura: contra blanco

Pipetear en tubos de ensayo.

BLANCO	ESTÁNDAR	MUESTRA	MUESTRA (SUERO)	-	-
	10ul	PATRON O ESTÁNDAR	-	10ul	-
REACTIVA	1ml		1ml	1ml	SOLUCION

Mezclar e incubar a 37oC por 15 minutos. Leer las absorbancias del standar y la muestra contra blanco reactivo. La absorbancia permanece estable por 30 minutos.

1- Cálculos:

Factor =

CONC. STANDAR

ABS. STANDAR

Concentración de glucosa mg/dl = Abs. Muestra x factor.

- Linealidad del método: Hasta 400 mg/dl, para concentraciones mayores diluir 1:2 con agua destilada repetir la técnica y multiplicarlo por el factor de dilución
- Valores normales: Suero o plasma: 70 - 110 mg/dl
- Interferencias

- Muestras hemolizadas

2. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL TOTAL

2.1. MÉTODO CALORIMÉTRICO. COLESTEROL OXIDASA/PEROXIDASA

- Fundamento: El colesterol y sus ésteres son separados de las lipoproteínas por detergentes.

Los ésteres de colesterol son hidrolizados por el colesterol esterasa a colesterol libre y ácidos grasos. El colesterol libre existente conjuntamente con el producido por esta reacción, es oxidado por la colesterol oxidasa a colesteno y peróxido de hidrógeno. Este último reacciona con la 4-aminoantipirina y fenol en presencia de peroxidasa produciendo quinoneimina coloreada de rojo, cuya concentración y absorbancia a 500 nm es

Directamente proporcional a la concentración de colesterol de la muestra.

ESTERES DE COLESTEROL + O₂ + H₂O

COLESTEROL
ESTERASA

COLESTEROL → ÁCIDOS GRASOS.

COLESTEROL + O₂ + H₂O

COLESTEROL
OXIDASA

COLESTENO + 3 ONA + H₂O₂

2H₂O₂ + 4-AMINOANTIPIRINA + FENOL

POD

QUINONEIMINA 4H 2 0

- Muestra: Suero o plasma heparinizado o con EDTA

El colesterol total es estable por lo menos 7 días a temperatura de +2 a +8°C.

- Reactivos:

- Reactivo A: piperato 35 mmol/L, colato sódico 0,5 mmol/L, fenol 28 mmol/L, colesterol esterasa, > 0,2 U/mL, peroxidasa > 0,8 U/mL, 4-aminoantipirina 0,5 mmol/L, pH 7,0.

- Patrón o standar (200 Mg/dl)

Todos los reactivos son estables hasta la fecha de vencimiento si se almacenan de 2 a 8°C.

- Técnica:

- Longitud de onda: 500 nm
- Paso de la luz a la cubeta: 1 cm
- Temperatura: 37°C
- Lectura: Contra blanco

Pipetear en tubos de ensayo.

	BLANCO	STANDAR	MUESTRA
MUESTRA (SUERO)	-	-	10ul
PATRON O ESTÁNDAR	-	-	10ul -
SOLUCION REACTIVA	1ml	1ml	1ml

Mezclar bien e incubar a 37°C por 5 minutos. Leer las absorbancias de la muestra y del Standard

Frente a blanco de reactivo. La absorbancia permanece estable por 30 minutos.

- Cálculos:

Factor =

Conc. Standar

Abs. Standar

Concentración de colesterol mg/dl = Abs. Muestra x factor.

- Linealidad del método: 500 mg/dl o 12.9 mmol/l.

	mg/dl	nmol/l
NORMAL	<200	<5.7
SOSPECHOSO	200 - 400	5.17 - 6.21
TRATAMIENTO NECESARIO	>240	>6.21

Para concentraciones mayores de 700 mg/dl diluir la muestra 1:2 con solución salina fisiológica, repetir la técnica y multiplicar por el factor de dilución (3).

2.2. CORRELACIÓN CLÍNICA

La alimentación rica en grasas aumenta los niveles de triglicérido. Las grasas en la dieta disminuye los niveles de quilomicrones pero la elevación de aportes de carbohidratos da lugar a un aumento de la producción endógena de triglicéridos.

Los triglicéridos se encuentran aumentados en hiperlipoproteinemia III y IV, además en el alcoholismo ya que hay excesiva movilización desde el tejido adiposo al hígado de triglicéridos por la liberación de hormonas y el fallo en la síntesis de lipoproteínas necesarias para el transporte de los triglicéridos por lo que se produce hepatitis grasa con gran número de células infiltradas con triglicéridos.

3. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL HDL

- Muestra: Suero o plasma
- Fundamento: La lipoproteína de alta densidad se separa de los quilomicrones de la VLDL y de las LDL por la adición de un reactivo de precipitación al suero o plasma. Después de centrifugar se determina el contenido de colesterol en la fracción HDL que permanece en el sobrenadante. Por el método colorimétrico enzimático utilizando colesterol esterasa, oxidasa, peroxidasa y un cromógeno.

- **Reactivos:**

- Reactivo A: fosfotungstato 0,4 mmol/L, cloruro magnésico 20 mmol/L.
- Reactivo B: fosfatos 35 mmol/L, colesterol esterasa > 0,2 U/mL, colesterol oxidasa > 0,1 U/mL, peroxidasa > 1 U/mL, 4-aminoantipirina 0,5 mmol/L, colato sódico 0,5 mmol/L, diclorofenol- sulfonato 4 mmol/L, pH 7,0.
- Estándar.

- **Procedimiento:**

- | | | | | |
|---------|---------|--------|------------|--------|
| Muestra | Muestra | 200 µL | Reactivo A | 500 µL |
|---------|---------|--------|------------|--------|
- Agitar bien y dejar 10 minutos a T°A
 - Centrifugar durante 10 minutos a un mínimo de 4000 r.p.m.
 - Recoger con cuidado el sobrenadante

Blanco	Muestra	Estándar H2O Destilada	50 µL	---	---	Sobrenadante
	50 µL Reactivo B	50 µL Standard	1 mL	---	---	---
				1 mL		

- Mezclar e incubar durante 30 minutos a T°A o durante 10 minutos a 37°C.
- Leer las absorbancias a 500nm frente al blanco. El color es estable al menos 30 minutos.

- Control de calidad:

Suero control Sera-chek. No se realiza, sólo se monta standard diariamente según la demanda de análisis.
 - Cálculos:

Abs Ata. X F = Concentración de la muestra

Factor = Abs del standard

Concentración del Standard

- Valores de referencia: VN= Mayor de 55 mg/dl Hombres VN= Mayor de 65 mg/dl Mujeres

Expresión de resultados: Se expresan en mg/dl
 8.7 Interferencias: Reactivos coloreados Suero icterico
 No precipitar la muestra antes de realizar la técnica

4. DETERMINACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS

4.1. MÉTODO COLORIMÉTRICO ENZIMÁTICO

- Fundamento: Los triglicéridos se hidrolizan enzimáticamente en glicerol y ácidos grasos libres, por medio de una combinación especial de lipasas. En la reacción se forma peróxido de hidrógeno el cual reacciona con el 2-clorofenol más 4-aminoantipirina con ayuda de una peroxidasa dando lugar a un cromógeno.

GLICEROL + ATP

GK

L - GLICEROL - 3 - FOSFATO + ADP

L - -GLICEROL - 3 - FOSFATO + 02 DIHIDROXIACETONA + H2O2

H2O2 + 2-CLOROFENOL + 4-AMINOANTIPIRINA

4 - (0-BENZOQUINONAMONO-IMINO) - FENAZONA + H2O + HCL

- Muestra: Suero o plasma heparinizado o con EDTA

- **Reactivo:**

- Pipetas

- Magnesio acetato
- 4-aminoantipirina
- ATP
- 2-clorofenol
- Peroxidasa
- Glicerolquinasa
- Glicerol - fosfato - oxidasa
- Lipasa
- Polietilenglicolmonoetileter
- Estabilizantes
- Activadores

- **Técnica:**

- Longitud de onda: 500 nm
- Paso de la luz a la cubeta: 1 cm
- Temperatura: 37°C
- Lectura: contra blanco de reactivo

Pipetear en tubos de ensayo.

BLANCO	ESTÁNDAR	MUESTRA	MUESTRA	-	-	
	10ul PATRON O ESTÁNDAR		-	10ul	-	SOLUCIÓN
REACTIVA	1ml		1ml		1ml	Mezclar e incubar durante 5 minutos a 37°C.

Medir las absorbancias de la muestra y del patrón contra blanco de reactivo.

- Cálculos:

Factor =

Conc. Standar

Abs. Standar

Concentración de triglicéridos = ABS. Muestra x factor.

- Límite de dilución: Si la concentración es superior a 1000 mg/dl ó 11 nmol/l, diluir la muestra 1:5 con solución salina fisiológica, repetir la técnica y multiplicar por el factor de dilución (6).

- Valores de referencia: Sospechoso a partir de 150 mg/dl ó 1.71 nmol/l. Elevado a partir de 200 mg/dl ó 2.29 mmol/l.

5. DETERMINACIÓN DE ACIDO URICO

5.1. MÉTODO. URICASA / PEROXIDASA

- Fundamento: El ácido úrico es oxidado a alantoína y bióxido de carbono por el ácido fosfotungstico en solución alcalina, y este último a su vez es reducido a azul de tungsteno cuya intensidad de color producido es proporcional a la concentración de ácido úrico de la Muestra.

ACIDO URICO + 2H₂O + O₂

URICASA

ALANTOINA + CO₂ + H₂O

2H₂O₂ + 3,5-DBHS + AAP

POD

Cromogeno + H₂O

- Muestra: Suero o plasma heparinizado o con EDTA. En caso de orina, esta se debe diluir

1/10 antes del ensayo. No se debe utilizar oxalato de potasio como anticoagulante debido a que durante el desarrollo del color aparece turbidez por la formación de fosfotungsteno de potasio el cual es insoluble. Muestras hemolizadas no deben utilizarse.

Luego de separar el suero la concentración en ácido úrico es estable 5 días de 2 a 8°C. Además se debe evitar la contaminación bacteriana.

- **Reactivos:**

- Reactivo A: fosfatos 100 mmol/L, detergente 1,5 g/L, diclorofenolsulfanato 4 mmol/L, uricase > 0,12 U/mL, ascorbato oxidasa > 5 U/mL, peroxidasa > 1 U/mL, 4-aminoantipirina 0,5 mmol/L, pH 7,8.
- Estándar: 6 mg/dL.

- **Técnica:**

- Longitud de onda: 500 nm
- Paso de luz a la cubeta: 1 cm
- Temperatura: 37°C
- Lectura: Contra blanco de reactivo

Pipetear en tubos de ensayo

BLANCO
ESTÁNDAR
MUESTRA

MUESTRA

-

-

25µL

ESTÁNDAR

-

25µL

-

REACTIVO

1ml

1ml

1ml

H2O DESTILADA 25µL

Mezclar e incubar por 5 minutos a 37°C ó 10 minutos a T°A y medir las absorbancias de la muestra y del Standard frente blanco de reactivo. Las absorbancias permanecen estables por 30 minutos.

- **Cálculos :**

Factor =

Conc. Standar

Abs. Standar

Concentración de ácido úrico = Abs Muestra x factor.

- Linealidad del método:

25 mg/dl ó 1.847 nmol/l

- Valores de referencia:

Hombres 3.4 - 7.0 mg/dl ó 200 - 400 mmol/l

Mujeres 2.4 - 5.7 mg/dl ó 144 - 300 mmol/l

6. DETERMINACIÓN DE BILIRRUBINA

6.1. MÉTODO

- Fundamento

La Bilirrubina reacciona con el ácido sulfanilico diazotado para formar compuesto azoico cuyo color es proporcional a la concentración de Bilirrubina.

- Muestra: Suero o Plasma

- Reactivos

- Nitrito Sódico
- Ácido Sulfanilico
- Cafeína
- Tartrato
- Solución Salina

- Preparación del reactivo

Los reactivos vienen listos para su uso la fecha de caducidad de los reactivos esta indicada en el estuche, la temperatura es de 2° a 8°C.

- Procedimiento

BCOBTBT BCOBDBD

Reactivo 1) 50 ul 50 ul

Reactivo 2) 0,1 ml 0,1ml 0,1ml 0,1ml

Reactivo 3)

0,5 ml

0,5 ml

Solución salina

1,00 ml

1,00 ml

Muestra

100 ul

100 ul

100 ul

100 ul

Mezclar y dejar reposar a temperatura Mezclar y dejar

Ambiente de 5 –30 minutos exactamente 5 minutos leer Contra el blanco a 546 nm
Reactivo 4 0,5ml 0,5ml

Mezclar y leer la absorbencia

A 578nm contra el blanco

- **Control de calidad**

No se lleva ninguna se corrige con el blanco muestra.

- **Valores de referencia**

Suero – BT – Hasta 1mg d

BD– Hasta 0,25mg L

- **Cálculos**

Suero Abs mta x 10,7 = BT

Suero Abs mta x 14,3 = BD

7. EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Los resultados se expresan en m/dl

- Interferencia
- Muestras que no hayan sido protegidas de la luz y que no sean recientes.
- No leer las muestras en los tiempos establecidos.
- No realizar el procedimiento con el montaje de los blancos muestras para cada bilirrubina.

8. DETERMINACIÓN DE UREA (BUN)

8.1. MÉTODO – UREASA/SALICILATO

- **Fundamento**

La ureasa divide la urea en amoníaco y dióxido de carbono, entonces se determina fotocolorimétricamente el amoníaco por la reacción de Berthelot.

- Muestra: Suero, plasma u orina. Diluir la orina 1/50 con agua destilada antes del ensayo
- Reactivos
 - Reactivo A1: salicilato sódico 62 mmol/L, nitroprusiato sódico 3,4 mmol/L, tampón fosfatos 20 mmol/L, pH 6,9
 - Reactivo A2: ureasa > 500 U/mL.
 - Reactivo B: hipoclorito sódico 7 mmol/L, hidróxido sódico 150 mmol/L
 - Estándar
- Preparación del reactivo

Reactivo B y estándar listos para usar. Reactivo de trabajo: vaciar el contenido del A2 en el frasco del A1, para otros volúmenes mezclar en proporción: 1 mL RX A2 + 24 mL Rx A1.

- Procedimiento

Blco
ST
MTA

RX trabajo
1ml
1ml
1ml

Muestra

10 µL

Estándar

10µL

- Incubar a 37°C por 5 minutos ó 10 minutos a T°A
- Adicionar 1mL del reactivo B en cada uno de los tubos

Seguir incubando a 37°C por 5 minutos ó 10 a T°A

Leer la absorbencia de muestra y la del estándar contra el blanco.

- Control de calidad

Montaje conectado del Standard de urea que debe tener una concentración de 40mg/dL

- Valores de referencia

Suero 7-18 mg/dL

- Cálculos

Suero Abs muestra

X 40 = mg de urea

Abs estándar

1mg urea – 0,467mg de BUN

6.2 Expresión de resultado

Los resultados se expresan en mg/dL para muestras de suero o plasma.

- Interferencias
 - No pipetear los reactivos en el orden señalado en la técnica.
 - No dispensar las cantidades establecidas.
 - Mayor tiempo de Incubación.
 - No diluir bien los reactivos en agua destilada antes de usarlos.

9. DETERMINACION DE CREATININA

9.1. MÉTODO PICRATO ALCALINO

- Fundamento.

La creatinina en SLN alcalina reacciona con el picrato para formar un Compuesto rojo anaranjado (Rx de Jaffé) color que se mide por lectura de dos puntos.

- Muestra. Suero ó plasma
Orina: diluida 1/50 con agua destilada.

- Reactivos.
 - Reactivo A: hidróxido sódico 0,4 mol/L, detergente
 - Reactivo B: ácido pícrico 25 mmol/L
 - Estándar
- Preparación del reactivo

Estándar listo para su uso. Reactivo de trabajo: mezclar volúmenes iguales de Rx A y Rx B.

- Procedimiento

St
Mta

Rx trabajo
1,0ml
1,0ml

St
100µL
-

Mta
-
100µL

Encender inmediatamente el cronómetro y mezclar inversión suavemente
Leer las absorbancias (A1) a los 30 segundos y A2 a los 90 segundos

- Control de calidad

Montaje conector del Standard de creatinina que debe tener una concentración en mg a de 2mg/ d

- Valor de referencia

Suero Hombres - 0,7mg/dl - 1,2mg/dL Mujeres - 0,5mg/dL - 1,0mg/dL
Orina Hombres - 21mg Kg. de peso 24h

Mujeres- 22mg kg de peso 24h


- Cálculos

Suero plasma Abs Muestra

X 2 – mg/ dl
Abs st

Orina Abs mta
X 1= g d
Abs st

- Expresión de resultados



Los resultados se expresan en mg/dL para muestra de suero ó plasma
La muestra de orina el resultado en g/dL pero se expresan mg/dL

- Interferencias
- Muestras hemolizadas pueden crear los niveles de creatinina en sangre.
- No realizar la lectura dentro de los tiempos establecidos.
- Paso del reactivo preparado con 2 horas de anticipación ya que este método se basa en la medición del color y el estar expuesto el reactivo mucho tiempo a la luz, concentra la reacción.

ELABORACIÓN INICIAL

CONTROL	FECHA	NOMBRES Y APELLIDO	CARGO
REALIZÓ	02-02-2020	Julia Rivero	Bacterióloga
REVISÓ	02-02-2020	Verenise Santiago F.	Auditora de Calidad
APROBÓ	02-02-2020	Yelitza Ayala Redondo	Gerente

CONTROL DE MODIFICACIONES

NOMBRE DOCUMENTO	CÓDIGO	VERSIÓN	FECHA MODIFICACIÓN	MODIFICACIÓN REALIZADA	RESPONSABLE
MANUAL DE QUÍMICA SANGUÍNEA	LABC-MA-012	01	02-02-2020	Todo el documento	Julia Rivero