

CAPÍTULO
BIOQUÍMICA Y ENZIMOLOGÍA
CLÍNICA BÁSICA
Elena Carretón y M. Candelaria Juste

4

INTRODUCCIÓN

Existen numerosos parámetros bioquímicos que pueden ser analizados y determinados. El panel bioquímico básico incluye grupos de parámetros que reflejan disfunción o daño en uno o varios sistemas orgánicos, por lo que el empleo de técnicas bioquímicas resulta de extrema utilidad.

EXTRACCIÓN Y REMISIÓN DE LAS MUESTRAS

El material y metodología de extracción sigue las mismas normas que las expuestas en el tema dedicado a la hematología. Para análisis bioquímicos y pruebas de enzimología, deberemos separar el plasma o el suero de los elementos formes sanguíneos.

ANTICOAGULANTES

Los anticoagulantes más utilizados son la heparina (heparina de sodio, litio o amonio) y el EDTA (ácido etilendiaminotetracético). Mención aparte merece el fluoruro/oxalato, que se utiliza en el caso de la determinación de glucosa, por su efecto inhibidor de la glucolisis.

Heparina

Los tubos de heparina generalmente tienen una tapa de color verde o naranja, aunque en algunos fabricantes puede variar el color. Es el anticoagulante que presenta un menor número de interferencias, por lo que será el de elección, aunque hay que tener en cuenta que dependiendo de la sal de heparina que se utilice, no podremos determinar sodio, litio o amoniaco. El plas-

ma heparinizado puede ser empleado para serología, bioquímica, y endocrinología de manera similar al suero. La sangre heparinizada sin separar es la muestra de elección para evaluar algunos parámetros, como la enzima glutatión peroxidasa (selenio), plomo, análisis de virus por PCR y análisis genéticos.

EDTA

Los tubos de EDTA generalmente tienen un tapón color morado-rosa o rojo. Basa su efecto anticoagulante en ser un que-



Figura 4.1. Tubos de recogida de muestras con heparina. Generalmente los tapones son verdes o naranjas, pero existen variaciones. Existen tubos de diferentes volúmenes según la cantidad de muestra necesaria.



Figura 4.2. Tubos de recogida de sangre para suero. Obsérvese la capa de gel deparador del coágulo al final del tubo.

lante (secuestrador) de calcio. Es también quelante de otros iones divalentes como el magnesio. Por tanto, no podremos determinar en plasmas con EDTA este tipo de iones (calcio o magnesio) ni enzimas que requieran estos iones para su actividad (por ejemplo, fosfatasa alcalina, amilasa o lipasa). Es el anticoagulante que mejor conserva la morfología de las células sanguíneas por lo que es de elección en estudios de hematología, citología y fibrinógeno.

Fluoruro sódico / oxalato potásico

Estos tubos tienen un tapón de color gris o amarillo. Este anticoagulante se emplea exclusivamente para inhibir la acción de las enzimas glucolíticas en los eritrocitos. Estas enzimas suelen ser las responsables de la disminución de los niveles de glucosa en las muestras sanguíneas pasadas pocas horas de su recogida. Sin embargo, si se va a emplear una tira reactiva seca para la determinación de glucosa, no deben utilizarse muestras anticoaguladas con oxalato, porque este inhibidor enzimático también inhibe las enzimas que se utilizan en la tira reactiva. Para evitar esto debe utilizarse sangre fresca o anticoagulada con heparina. Igualmente, el fluoruro/oxalato tampoco es adecuado para medir los niveles de calcio puesto que este anticoagulante es quelante (secuestrador) del calcio y da lugar a falsas lecturas anormalmente bajas. En la práctica este tipo de anticoagulante no se emplea apenas; si la clínica dispone de una centrífuga y el plasma puede separarse en menos de una hora desde el momento de la extracción, el plasma obtenido en tubos de heparina es perfectamente válido para la medición de los niveles de glucosa.

Citrato sódico

Los tubos de citrato sódico tienen un tapón de color azul pálido o verde, y se emplean exclusivamente para estudios de parámetros de coagulación. Tienen una pequeña marca en el lateral y es importante que los tubos se llenen de sangre hasta esa marca para que el ratio citrato/sangre sea correcto, ya que ratios incorrectos pueden llevar a errores en los resultados de las analíticas.

¿PLASMA O SUERO?

El plasma es la fracción líquida y acelular de la sangre, representando aproximadamente el 55% del volumen sanguíneo total. El suero, es el remanente del plasma sanguíneo

una vez consumidos los factores hemostáticos por la coagulación de la sangre.

La separación del suero o plasma evita la contaminación con el contenido de los eritrocitos cuando se produce hemólisis. La exposición al calor, el frío o la agitación enérgica incrementan la hemólisis. Si una muestra va a ser enviada a un laboratorio externo, se recomienda separar el suero o el plasma.

Muestra de plasma

El plasma se obtiene separando los componentes celulares de una muestra de sangre entera con anticoagulante. Así la sangre se recoge en un tubo heparinizado o con EDTA y después se separa el plasma heparinizado o con EDTA de los eritrocitos. A continuación se etiqueta la muestra con las especificaciones de rutina y se especifica el anticoagulante empleado.

Muestra de suero

Generalmente, los tubos de suero tienen el tapón rojo aunque la coloración puede va-

Tabla 4.1 Diferencias entre suero y plasma.

Suero	Derivado de la separación de las células sanguíneas y el fluido hemático tras la formación del coágulo.
Plasma	Derivado de la separación de las células sanguíneas y el fluido a partir de sangre sin coagular mediante centrifugación.

Tabla 4.2 Anticoagulantes que se deben emplear en función de la prueba a realizar.

Tubo	Color	Función
Suero	Rojo	Bioquímica, serología, endocrinología.
Heparina	Verde o naranja	<ul style="list-style-type: none"> Sangre entera: selenio, plomo, estudios genéticos, PCR de virus, BVD virus, hematología en aves y reptiles. Plasma: bioquímica, serología, endocrinología.
Suero separado	Marrón o amarillo	Bioquímica, serología
EDTA	Púrpura o rosa	Hematología en mamíferos, citología de fluidos, fibrinógeno.
Oxalato-fluoride	Gris o amarillo	Glucosa.
Citrato	Azul pálido o verde	Tiempos de coagulación.

riar según el fabricante. Estos tubos no contienen anticoagulante por lo que la sangre se coagula dentro del tubo y se separa para formar suero y un coágulo celular. El coágulo no es necesario para ningún análisis.

Para obtenerlo se deja que se forme un coágulo a temperatura ambiente, lejos de la luz solar. Cuando el coágulo se haya retraído (tarda aproximadamente 1-2 horas) se puede separar del suero, liberándolo de la pared del tubo con una varilla. Posteriormente, la muestra se puede centrifugar a 3000 RPM durante 5 minutos, y mediante una pipeta, el suero se recoge y se almacena en alícuotas. Si no se separa el suero del coágulo, este se romperá durante el transporte y el suero aparecerá hemolizado.

Existen tubos que tienen una capa de gel separador del coágulo que, tras la centrifugación de la muestra, constituye una barrera entre las células y el suero. Como se trata de un gel inerte, este tubo separa las células del suero y permite que el gel prevenga la hemólisis y que el suero no tenga que ser pipeteado en un tubo aparte o, en caso de hacerlo, facilita la separación de la muestra. Sin embargo, estos tubos deben ser centrifugados, y además, aunque la mayoría de parámetros no se ven afectados por este gel, no se recomienda su uso para medir niveles de determinados parámetros, como fármacos (principalmente barbitúricos) o algunos parámetros endocrinos.

CONSERVACIÓN DEL PLASMA Y DEL SUERO

Se pueden refrigerar a 4°C un máximo de 48 horas o congelar durante períodos largos de tiempo. Si la muestra se va a congelar, dejar un espacio suficiente en

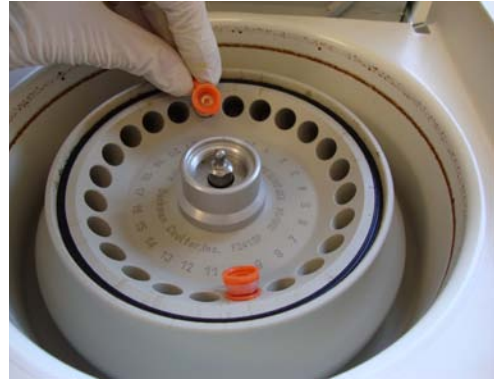


Figura 4.3. Centrifugado de la sangre para la obtención de plasma. Si sólo se va a centrifugar una muestra, se debe equilibrar con un tubo idéntico, y relleno de una cantidad similar de agua.



Figura 4.4. Tubo de recogida de suero. Coágulo formado en un tubo de recogida de muestra para la obtención de suero, sin gel separador. Una vez extraída la sangre no se debe remover, sino dejar reposar en una gradilla hasta la formación del coágulo.

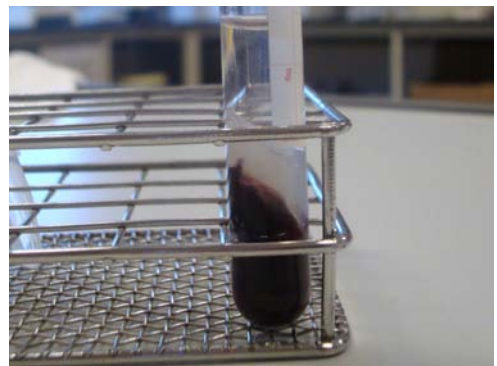


Figura 4.5. Tubo de recogida de suero tras la centrifugación. El tubo de suero con gel separador debe ser centrifugado. En la imagen se puede observar cómo el gel separa el suero de las células tras la centrifugación.

el tubo para permitir la expansión durante la congelación. Hay parámetros que son estables en las muestras durante períodos variables. Consultar siempre con el laboratorio cuánto tiempo se puede almacenar una muestra. Cuando hayan sido congeladas o refrigeradas se devolverán lentamente a la temperatura ambiente antes de ser examinadas.

La congelación se utiliza para algunas pruebas sanguíneas no rutinarias como la determinación de los niveles de hormonas.



Figura 4.6. Identificación de la muestra. El tubo con anticoagulante debe ser identificado correctamente con la fecha y datos del paciente, antes de la remisión al laboratorio para evitar errores en el análisis e interpretación de los resultados.

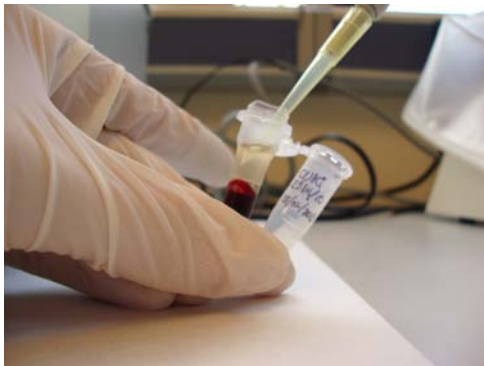


Figura 4.7. Separación del plasma. Se debe separar el plasma de las células cuanto antes para evitar hemólisis y degradación de algunos parámetros, resultando en alteraciones de los resultados de la muestra.

A -10°C las muestras se conservan durante una semana pero a temperaturas más bajas (-15°C hasta -20°C) se conservan indefinidamente.

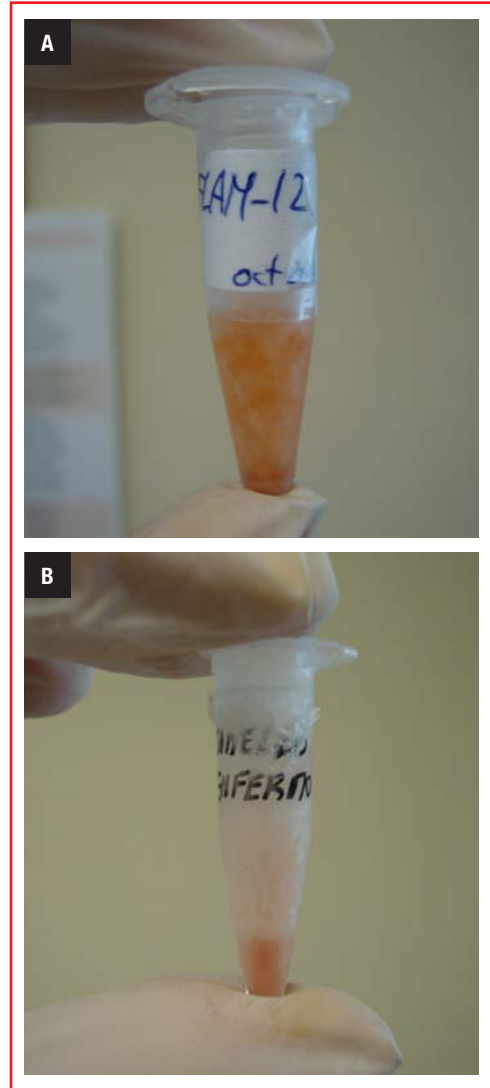


Figura 4.8. Muestra de suero congelada. Si no se va a analizar inmediatamente, se recomienda congelar la muestra de suero o plasma. Se debe etiquetar convenientemente para evitar errores. Se recomienda emplear etiquetas adhesivas (A), ya que si se rotula la alícuota directamente, la humedad al descongelar junto con el manejo puede hacer que la información se borre (B).

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El objetivo central de la bioquímica clínica es medir los diferentes elementos que forman parte de los fluidos corporales, con finalidad diagnóstica o pronóstica. El veterinario podrá basar su decisión en el resultado obtenido, de ahí la importancia de obtener resultados fiables y reproducibles.

El objetivo de realizar análisis bioquímicos puede ser obtención o confirmación de un diagnóstico, conocimiento del grado de severidad de una determinada enfermedad o seguimiento del curso de la misma.

Los valores obtenidos se contrastan con los rangos de referencia. Estos rangos se refieren al intervalo de resultados de un determinado metabolito que se obtienen en animales sanos. Estos intervalos pueden ser determinados por la propia clínica en base a una serie de mediciones realizadas en muestras de animales sanos o, más habitualmente, son proporcionados por el fabricante.

Para que esta comparación sea correcta, se han de cumplir una serie de condiciones:

- Poblaciones de referencia bien definidas: Los valores de referencia deben ser definidos de la forma más estricta posible. Por ejemplo, los valores de determinados parámetros (como la fosfatasa alcalina) para perros sanos pueden variar dependiendo de si es un cachorro o un animal geriátrico. Igualmente pueden existir diferencias según el sexo o la raza. En cualquier caso el paciente debe encajar dentro del grupo poblacional con el cual se compara.
- Condiciones de obtención de la muestra: Es importante conocer si se trata de va-

lores en suero o plasma (y en este caso, el anticoagulante utilizado) y aspectos tales como si el animal está o no sometido a ayuno en el momento de la extracción; además entre otros aspectos pueden existir variaciones según se trate de sangre venosa o arterial, o debidas al ritmo circadiano como sucede en la medición del cortisol.

- Los resultados deben ser obtenidos por métodos estandarizados: generalmente existen varios métodos para realizar una misma determinación. Las mediciones de los valores en el caso de metabolitos deben ser similares independientemente del método utilizado. Sin embargo, en el caso de las mediciones de valores enzimáticos, pequeñas diferencias en las condiciones de ensayo (temperatura, pH, tampón, presencia de activadores, etc.) pueden modificar de manera notable la actividad enzimática. También es importante saber que los rangos pueden variar entre diferentes aparatos de análisis bioquímica.
- Emplear las mismas unidades: el Sistema Internacional de Unidades (SI) es el más frecuente y el recomendado para las profesiones sanitarias por la World Health Assembly. En el caso de metabolitos, esto implica la utilización de los moles, milimoles (mmoles) y micromoles (μ moles) en lugar de gramos o miligramos en compuestos con una composición química definida, y se debe utilizar el litro (y no el decilitro) como unidad de volumen. En el caso de enzimas es de uso aún muy extendido la Unidad Internacional (UI o sólo U), que normalmente se expresa como medida de la concentración de la actividad enzimática

en U/litro. En caso de expresarse los valores obtenidos con otras unidades, existen tablas de conversión.

- Variación biológica: existen variaciones biológicas en un mismo animal y entre animales, en un momento determinado. Estas variaciones son independientes del método analítico utilizado.

ERRORES EN LOS ANÁLISIS BIOQUÍMICOS

Las principales causas de error en la obtención de resultados analíticos se citan a continuación.

VARIACIONES PRE-ANALÍTICAS

Son las referidas al transporte de la muestra, tiempo transcurrido desde la extracción, tiempo de centrifugación, condiciones de conservación, entre otras. Las variaciones



Figura 4.9. Cachorro de perro mestizo de 20 días. Los valores de referencia para perros sanos pueden ser diferentes en animales en crecimiento respecto a animales adultos o geriátricos. Se debe definir correctamente el grupo poblacional al que corresponde la muestra a analizar para evitar errores de interpretación.

debidas a estas causas deben minimizarse mediante una normalización de esta fase.

Alimentos

El animal deberá acudir en ayunas ya que la lipemia que aparece tras una ingesta puede interferir en los resultados analíticos. Entre los parámetros que se ven afectados por la ingesta de comida, están el aumento de la fosfatasa alcalina (2-4 horas tras la comida), urea, glucosa, amilasa, lipasa, triglicéridos o potasio. Lo ideal es permanecer en ayunas durante las 12 horas anteriores a la extracción. Por otro lado, anorexia o ayunos prolongados de más de 24 horas pueden dar lugar a aparición de otras alteraciones en los resultados, como son disminución de los valores de glucosa o de sodio, y elevaciones del potasio, creatinina, fosfatasa alcalina y LDH.

Cuadro 4.1

Motivos más frecuentes de obtención de resultados imprecisos o erróneos.

- Reactivos de poca calidad, mal conservados o caducados.
- Falta de calibraciones y controles periódicos.
- Técnicas de pipeteado inadecuadas.
- Inadecuado mantenimiento del equipo de bioquímica.
- Muestras lipémicas o hemolíticas.
- No separar el suero o plasma del resto de componentes sanguíneos en un periodo breve de tiempo.
- No respetar los tiempos de calentamiento del equipo de bioquímica.
- Emplear cubetas inadecuadas.
- Sobrecargas o fallos eléctricos.

Estado de hidratación

El nivel de hidratación del animal afectará a la actividad de los metabolitos debido a la variación del contenido de agua en el plasma. La hemoconcentración que se produce por deshidratación aumentará significativamente ciertos valores hematológicos; en cuanto a los valores bioquímicos, la deshidratación produce la elevación de las proteínas totales y de la albúmina, así como los valores de urea y creatinina, y los iones sodio y potasio.



Figura 4.10. Plasma hiperlipémico. Procedente de un perro tras ingesta reciente de alimentos; se puede apreciar el aspecto blanquecino por la presencia de lípidos.



Figura 4.11. Compresión de la vena cefálica. El uso prolongado de torniquete o compresión puede producir hemoconcentración y elevar falsamente algunos resultados. Si se ha mantenido la compresión mucho tiempo y aún no se ha extraído la muestra, dejar que la sangre circule unos minutos antes de volver a intentarlo.

Durante la extracción

Durante la toma de muestra se deben tener en cuenta una serie de factores, como son postura del animal, vaso del que se extrae la sangre, etc. El uso prolongado del torniquete puede dar falsas elevaciones de algunos parámetros al producir hemoconcentración en los vasos sanguíneos, como colesterol, triglicéridos, calcio y hierro, GPT y GOT. Igualmente, no se recomienda la extracción de sangre a partir de un catéter intravenoso.

Cambios fisiológicos

Los cambios fisiológicos también afectan al momento de la recogida de las muestras, por lo que se deben tener en cuenta. Por ejemplo, un gato estresado en el momento de la recogida puede presentar hiperglicemia (valores de glucosa elevados). Igualmente, existen variaciones diurnas normales en algunos niveles de hormonas, por lo que se debe conocer la hora de la recogida de la muestra.



Figura 4.12. Recogida de sangre por catéter intravenoso. No se recomienda tomar la muestra de sangre mediante un catéter intravenoso, porque puede alterar los resultados. Si se va a hacer igualmente, desechar la primera parte de la muestra de sangre ya que puede estar diluida.

Tipo de muestra analizada

Aunque buena parte de las determinaciones bioquímicas pueden realizarse tanto en suero como en plasma, muchos laboratorios prefieren el suero, ya que este reduce la probabilidad de formación de coágulos de microfibrina en la muestra que pueden interferir con la analítica; igualmente, si no se forma el coágulo completo o no se centrifuga, se pueden formar coágulos de fibrina en la muestra de suero que causen igualmente problemas durante el análisis. Además, algunos resultados pueden diferir según se trate de uno u otro: básicamente la concentración de proteínas y el proteiograma.

Anticoagulantes

El EDTA puede modificar las variaciones de una serie de analitos, que pueden aumentar su valor si el anticoagulante los contiene. Este es el caso del potasio, que aumenta hasta tres veces sus valores al cuantificarlo en EDTA tripotásico, mien-

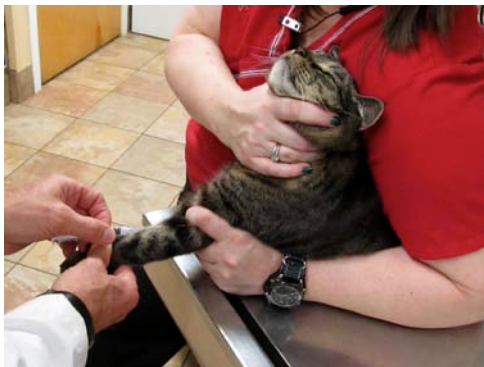


Figura 4.13. Gato en consulta veterinaria durante la extracción de sangre. El estrés durante el manejo y extracción de sangre en la especie felina puede hacer que se eleven los valores de glucosa por encima de los valores de referencia para gatos sanos sin que tenga ningún significado patológico.

tras que en el caso del calcio, como es secuestrado por el anticoagulante, obtendremos mediciones bajas o nulas. Igualmente, este anticoagulante disminuye enormemente los valores de fosfatasa alcalina.

Conservación y transporte de la muestra

Posteriormente, las muestras extraídas deben conservarse adecuadamente para evitar cualquier alteración que se pudiera producir antes de su análisis, como se ha explicado anteriormente en este capítulo. Finalmente, las muestras recogidas en un tubo adecuado cerrado herméticamente deben remitirse debidamente etiquetadas e identificadas con el nombre o historial del paciente, fecha de recogida y tipo de muestra. Además, se debe adjuntar una hoja de remisión junto con la muestra donde se indiquen las pruebas solicitadas, datos del paciente (especie, raza, edad, sexo...), con una breve historia y hallazgos clínicos. Se deben enviar al laboratorio empleando los servicios de mensajería apropiados para que lleguen en el menor tiempo posible, debidamente embalados. Se recomienda emplear cajas de poliestireno (el llamado “corcho blanco”) con gel refrigerante o acumuladores de hielo, y las muestras acomodadas adecuadamente para que no se desplacen durante el transporte.

Hemólisis

Aparece cuando los eritrocitos se rompen y parte de su contenido pasa al suero o al plasma. Es fácilmente observable, puesto que las muestras adquieren una coloración roja debido al contenido en hemoglobina, en lugar del rosa muy pálido de un suero obtenido en buenas condiciones. En algunos casos, la

hemólisis puede ser consecuencia de una patología, aunque en muchos otros es debida a un mal procesamiento de la muestra. En una muestra hemolítica podemos encontrar las siguientes alteraciones:

- Hay un aumento de los parámetros que, en condiciones normales, se encuentran en gran concentración en el interior del eritrocito, y que salen al exterior en el caso de una muestra hemolítica. Son principalmente el potasio, más notable en algunas razas de perros que en otras, y



Figura 4.14. Caja de poliestireno. Las muestras que se van a remitir a un laboratorio especializado deben embalarse adecuadamente y remitirse en una caja de poliestireno a través de un servicio de mensajería.



Figura 4.15. Hemólisis. En el tubo de la izquierda se observa una muestra de sangre hemolizada. La hemólisis da lugar a alteraciones en la lectura de los resultados, por lo que debe evitarse.

enzimas como la ALT/GPT, CPK, LDH (cuya concentración dentro de los hematíes es 150 veces superior a la del suero) o la AST/GOT.

- Influencia del metabolismo celular. Las enzimas que se encontraban en el interior del eritrocito siguen trabajando en un suero hemolítico durante un tiempo bastante prolongado. La principal consecuencia de este proceso es la disminución de la concentración de la glucosa sérica.
- Proteinograma. La hemoglobina, liberada por la hemólisis, puede causar problemas en la interpretación del proteinograma.
- Ciertas técnicas enzimáticas que miden longitudes de onda entre 300-500 nm, con solapamiento en el rojo, sufrirán variaciones, como en el caso de la fosfatasa alcalina, o la gamma glutamil transpeptidasa (GGT).

¿Qué precauciones debemos tomar para impedir que una sangre se hemolice? Todas ellas constituyen medidas lógicas y conviene introducirlas de manera rutinaria en la clínica:

- Condiciones correctas de extracción de la muestra, como una compresión venosa poco prolongada, y evitar las aspiraciones muy rápidas y presiones forzadas durante la extracción.
- Mezclar la muestra de sangre con el anticoagulante con suavidad, sin agitar el tubo.
- Separación rápida de las células mediante centrifugación, evitando la centrifugación demasiado fuerte.

- Evitar el transporte de sangre total y los cambios bruscos de temperatura.
- No congelar sangre total en ningún caso. Si se desea refrigerar la muestra de sangre entera, se debe dejar a temperatura ambiente durante 10-15 minutos antes de introducirla en la nevera, pues si se hace de forma inmediata se produce un shock térmico que podría romper los hematíes, con la consiguiente hemólisis.

Hiperlipemia

Producida por la presencia de lípidos en el suero, especialmente triglicéridos, confiriéndole un aspecto turbio o incluso lechoso. La hiperlipemia puede ser debida a situaciones patológicas (hipotiroidismo, hiperadrenocorticismo, diabetes o dislipemia primaria), aunque en la mayoría de ocasiones la causa es sencillamente la extracción sanguínea a un animal no sometido a ayuno. En este caso, la mejor solución es repetir la extracción en condiciones adecuadas. Si esto no es posible, se puede in-

tentar diluir la muestra y/o realizar blancos de muestra adecuados. En el caso que sea necesaria la eliminación de los quilomicrones, se puede conseguir parcialmente de forma sencilla dejando el suero en reposo a 4° C durante unas horas. La lipemia provoca modificaciones en los resultados bioquímicos y hematológicos, ya que afecta a la dispersión de la luz de los métodos espectrofotométricos. Según el método empleado, los valores de proteínas totales podrían verse aumentados, o los valores de electrolitos podrían estar disminuidos.

Hiperbilirrubinemia

Es siempre un signo patológico. En el caso de tener que efectuar determinaciones en una muestra icterica en las que pueda existir interferencia por utilizar la longitud de onda correspondiente al amarillo (como en el caso de la fosfatasa alcalina), se deberá realizar un blanco de muestra para corregir el error. Según el método empleado para realizar el análisis, la hiperbilirrubinemia puede elevar los valores de albúmina, colesteroles, glucosa, fósforo inorgánico o pro-

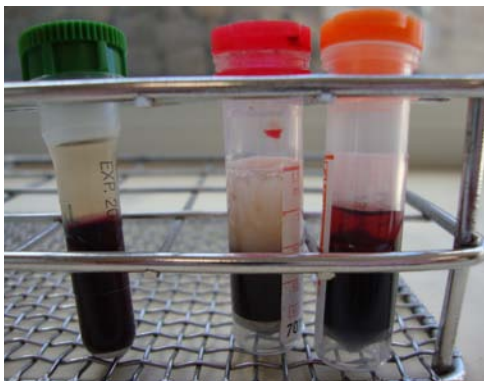


Figura 4.16. Alteraciones de la muestra de plasma. En la imagen se puede observar un plasma normal (izquierda), lipémico (centro) y hemolizado (derecha).



Figura 4.17. Suero icterico. Procede de un perro Pastor Alemán de 4 años diagnosticado de hepatitis vírica canina.