

# ORGANIZACIÓN DE LA SECCIÓN DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

<i>Autoras</i>	Dra. Tania Carballo Treto Lic. Rosalía Baltar López Lic. Gladys Fleites Herrera
<i>Departamento</i>	Laboratorio Clínico

## CONTENIDO

- Sección de proteínas
  - ✧ Electroforesis de proteínas en acetato de celulosa
  - ✧ Determinación fotométrica de ceruloplasmina
- Sección de lípidos
  - ✧ Determinación de HDL colesterol
  - ✧ Determinación de VLDL -colesterol
  - ✧ Determinación de LDL -colesterol
  - ✧ Electroforesis de lipoproteínas

La sección cuenta con los siguientes puestos de trabajo:

- Proteínas: se realiza la determinación de ceruloplasmina.
- Lípidos: en el se realiza la técnica de HDL colesterol.
- Electroforesis: se realizan las técnicas de electroforesis de proteínas y lipoproteínas.

Los resultados de todas las determinaciones se introducen en la computadora en el programa **GALEN** diseñado para este fin entre las 24 y 48 horas de realizado.

## Sección de proteínas

- ***Electroforesis de proteínas en acetato de celulosa.***

Fundamento del método

- ✧ Se basa en el principio básico de la movilidad de las proteínas cuando se les aplica la acción de un campo eléctrico atendiendo a su punto isoeléctrico.

Reactivos químicos

- ✧ Ácido dietil barbitúrico
- ✧ Dietilbarbiturato de sodio
- ✧ Colorante negro amido

- ✧ Etanol
- ✧ Ácido acético glacial
- ✧ Metanol 99 %

#### Utensilios y aparatos de medición

- ✧ Matraz aforado de 2000 mL
- ✧ Probetas de 100, 500 mL
- ✧ Balanza analítica
- ✧ Espátula
- ✧ Medidor de pH.
- ✧ Acetato de celulosa
- ✧ Balas eppendorf
- ✧ Lápiz cristalográfico
- ✧ Aplicador de muestras
- ✧ Pinza
- ✧ Papel de filtro
- ✧ Láminas de vidrio
- ✧ Cubeta electroforética
- ✧ Fuente de poder
- ✧ Reloj de timbre
- ✧ Horno
- ✧ Densitómetro

#### Preparación de los reactivos.

- Solución buffer Veronal (ph 8.6)
  - Ácido dietil barbitúrico ----- 3 g
  - Dietilbarbiturato de sodio ----- 20.6 g
  - H<sub>2</sub>O destilada c.s.p. ----- 2 000 mL
- Colorante negro amido
  - Colorante negro amido ----- 2 g
  - Etanol ----- 450 mL
  - Ácido acético glacial ----- 100 mL
  - H<sub>2</sub>O destilada c.s.p. ----- 450 mL
- Solución de lavado

Metanol 99 % ----- 100 mL

- Solución transparentadora

Ácido acético glacial ----- 8 mL

Metanol ----- 42 mL

Muestra:

- Suero fresco no hemolizado.

Procedimiento

- Buscar las muestras a procesar en el departamento de recepción y procesamiento de muestras según la lista de trabajo.
- Humedecer en el buffer el acetato de celulosa (5 minutos)
- Seleccionar 5 minutos en el reloj de timbre.
- Secar el exceso de buffer con papel de filtro haciendo una ligera presión de forma uniforme sobre el acetato de celulosa.
- Colocar con la pinza el acetato de celulosa en la cubeta electroforética, cerrar la tapa. Establecer y aplicar las condiciones eléctricas de la corrida durante 5 minutos seleccionándolo en el reloj de timbre. (Voltaje 100 Volt, intensidad de la corriente 8 – 10 mA)
- Apagar la fuente de poder.
- Abrir la tapa de la cubeta y aplicar las muestras según el orden predeterminado, haciendo un protocolo de aplicación de las mismas.
- Cerrar la tapa y encender la fuente de poder. Tiempo de corrida 15 minutos seleccionándolo en el reloj de timbre.
- Apagar la fuente de poder y retirar con la pinza el acetato de celulosa.
- Sumergir el acetato en el colorante durante 15 minutos seleccionándolo en el reloj de timbre.
- Sacar el acetato y sumergirlo en la solución de lavado durante 1 minuto.
- Retirarlo y sumergirlo en la solución transparentadora durante 5 minutos seleccionándolo en el reloj de timbre.
- Retirla y extender el acetato sobre la lámina de vidrio, evitando la formación de burbujas de aire entre el acetato y el cristal.
- Colocar la lámina en el horno a 80 °C durante 3 minutos seleccionándolo en el reloj de timbre.
- Retirar y realizar la lectura en el densitómetro.

- Lectura en el densitómetro.

#### Informe de los resultados

- ✧ Los resultados serán anotados en la lista de trabajo y luego serán introducidos en la computadora en el programa **GALEN** al cual pueden acceder los médicos y el departamento de entrega de resultados para obtener los mismos.
- ✧ Los gráficos emitidos por el densitómetro serán adjuntados a cada lista de para pegarse en el resultado impreso de cada paciente.

#### Control de calidad

- ✧ Suero control comercial Precilip, que incluye proteínas totales y las 5 subfracciones: Albúmina,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ .
- ✧ En su ausencia se emplea Precinorm U suero control, que incluye proteínas totales y la albúmina.

*En ambos casos procesar cada día 1 muestra duplicada para evaluar repetibilidad.*

Valores de referencia:

Aspecto	Min	Máx	Ud
Albúmina	40,03	51,35	g/L
$\alpha_1$ (alfa 1)	0.66	1.90	g/L
$\alpha_2$ (alfa 2)	3.46	6.45	g/L
$\beta$ (beta)	6.23	10.11	g/L
$\gamma$ (gamma)	10.16	18.50	g/L

- ***Determinación fotométrica de ceruloplasmina***

#### Fundamento del método

- ✧ Método de Robin modificado: la ceruloplasmina es una glucoproteína que funciona *in vitro* como una oxidasa, catalizando la oxidación del hierro ferroso en férrico y transporta el cobre. El sustrato p-fenilendiamina es un producto de color pardo tenue y su compuesto de oxidación es púrpura cuya intensidad de color está en relación directa a la concentración de ceruloplasmina en suero.

#### Reactivos químicos:

- ✧ Diclorohidrato de p-fenilendiamina
- ✧ Acetato de sodio anhidro
- ✧ Ácido acético glacial
- ✧ Azida Sódica

#### Utensilios y aparatos de medición:

- ✧ Matraz aforado de 50 mL
- ✧ Papel de aluminio o papel negro.
- ✧ Balanza analítica
- ✧ Espátula
- ✧ Peachímetro
- ✧ Tubos de ensayo de 12 x 75 mm
- ✧ Lápiz cristalográfico
- ✧ Puntas plásticas amarillas y azules
- ✧ Pipetas automáticas de 50 y 500  $\mu\text{L}$
- ✧ Gradillas de metal
- ✧ Baño de María
- ✧ Reloj de timbre
- ✧ Balas eppendorf

#### Preparación de los reactivos

- ✧ Sustrato diclorohidrato de p-fenilendiamina al 0.5 %

Diclorohidrato de p-fenilendiamina ----- 0.250 g

H<sub>2</sub>O destilada c.s.p. ----- 50 mL

Filtrar y guardar en congelación al abrigo de la luz.

*Nota: Este reactivo es fotosensible, prepararlo con rapidez y proteger el volumétrico con papel de aluminio o negro. Una vez congelado para usarlo nuevamente descongelarlo y agitarlo bien. Es estable por un año.*

- ✧ Buffer acetato de sodio 0.4 M pH 5.5

Acetato de sodio anhidro ----- 25 g

H<sub>2</sub>O destilada c.s.p ----- 900 mL

Ácido acético glacial ----- 11 mL

Medir y ajustar el pH a 5.5

Completar a 1000 mL con H<sub>2</sub>O destilada y guardar de 4 – 8 °C

- ✧ Azida sódica 0.5 %

Azida Sódica ----- 0.5 g

H<sub>2</sub>O destilada c.s.p ----- 100 mL

Guardar de 4 – 8 °C

### Muestra

- ✧ Suero o plasma heparinizado.

### Conservación

- ✧ Es estable durante 2 semanas a 4 °C.

### Procedimiento

- ✧ Buscar en el departamento de recepción y procesamiento de muestras según la lista de trabajo las muestras a procesar.

	<i><b>Blanco</b></i>	<i><b>Control</b></i>	<i><b>Muestra</b></i>
Buffer Acetato de Na	4 mL	4 mL	4 mL
Control		50 µL	
Suero			50 µL
Sustrato	500 µL	500 µL	500 µL
Azida sódica	500 µL		
Incubar a en el baño de maría a 37 °C durante 1 hora protegido de la luz			
Azida sódica		500 µL	500 µL
Poner a 8 °C durante 30 minutos			
Leer contra blanco a 530 nm en el espectrofotómetro			

### Cálculo de la concentración:

$$[\text{Ceruloplasmina}] \text{ g/L} = \text{Densidad óptica de la muestra} \times 87.5$$

### Informe de los resultados.

- ✧ Los resultados serán anotados en la lista de trabajo y luego serán introducidos en la computadora en el programa **GALEN** al cual pueden acceder los médicos y el departamento de entrega de resultados para obtener los mismos.

### Control de Calidad

- ✧ Se procesa por duplicado una muestra de paciente con valor conocido normal de ceruloplasmina.

### Valores de referencia.

Hombres: 0,325-0,588 g/L  
Mujeres: 0,383-0,661 g/L

## Sección de lípidos

- *Determinación de HDL colesterol*

#### Fundamento del método:

- ✧ Método modificado con pre-tratamiento de CHOP-PAP. Se separan previamente al análisis las fracciones beta usando como precipitante cloruro de magnesio y fosfotungstato de sodio y luego se mide el colesterol del sobrenadante por el método de colesterol CHOP-PAP descrito en la sección de química clínica.

#### Reactivos químicos

- ✧ Cloruro de magnesio 6 H<sub>2</sub>O 1.2 M
- ✧ Ácido fosfotúngstico H<sub>2</sub>O
- ✧ Hidróxido de sodio 0.1 M
- ✧ Solución salina 0.9 %

#### Utensilios y aparatos de medición

- ✧ Matraz aforado de 100, 1000 ml
- ✧ Balanza analítica
- ✧ Espátula
- ✧ Balas eppendorf
- ✧ Puntas plásticas amarillas y azules
- ✧ Pipetas automáticas de 25, 100, 500 y 1000 µL
- ✧ Gradillas plásticas
- ✧ Copillas de muestras
- ✧ Lápiz cristalográfico
- ✧ Microcentrífuga de 14 000 rpm.
- ✧ Autoanalizador químico

#### Preparación de los reactivos

- ✧ Solución de Hidróxido de sodio 0.1 M  
NaOH ----- 4 g  
H<sub>2</sub>O c.s.p. ----- 1000 mL
- ✧ Solución de Cloruro de Magnesio 1.2 M  
MgCl<sub>2</sub> 6 H<sub>2</sub>O ----- 40.66 g  
H<sub>2</sub>O c.s.p. ----- 100 mL
- ✧ Solución de fosfotungstato de sodio  
Ácido fosfotúngstico ----- 4 g  
NaOH 0.1 M ----- 16 mL  
H<sub>2</sub>O c.s.p. ----- 100 mL

## Muestra

- ✧ Suero o plasma heparinizado
- ✧ Conservación: Estable durante 3 meses en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$   
Estable durante 7 días a  $4^{\circ}\text{C}$

## Procedimiento.

- ✧ Buscar las muestras a procesar en el departamento de recepción y procesamiento de muestras según la lista de trabajo.
- ✧ Inspeccionar el aspecto del suero: si está turbio se debe señalar en la lista de trabajo.
- ✧ Depositar en una bala eppendorf la muestra y los reactivos según se describe en la tabla.
- ✧ Si la muestra es turbia se procederá a diluir la misma de la siguiente manera:
- ✧ Tomar  $500\ \mu\text{L}$  de suero en una bala eppendorf
- ✧ Adicionar  $500\ \mu\text{L}$  de solución salina
- ✧ El volumen final ( $1\ \text{mL}$ ) será el utilizado como muestra en el procedimiento que se describe en la tabla del método.

*Nota: El resultado de la concentración de HDL colesterol que se obtenga en este caso deberá multiplicarse por 2 ó por el factor de dilución que se haya utilizado.*

	<i>Control</i>	<i>Muestra</i>
-Control	1 mL	
-Suero		1 mL
-Solución de $\text{MgCl}_2$ 1.2 M	25 $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$
-Solución ácido fosfotúngstico	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
Mezclar y dejar reposar durante 20 min. temperatura ambiente		
-Centrifugar durante 2 minutos a 14 000 rpm.		
-Rotular las copillas de lecturas con el # de identificación de las muestras según lista de trabajo.		
-Tomar una alícuota del sobrenadante y verterlo en las copillas para lectura debidamente rotuladas con la identificación de las muestras.		
-Leer la concentración en el autoanalizador químico		

## Informe de los resultados

- ✧ Los resultados serán anotados en la lista de trabajo y luego serán introducidos en la computadora en el programa **GALEN** al cual pueden

acceder los médicos y el departamento de entrega de resultados para obtener los mismos.

#### Control de calidad

- ✧ Se utilizan sueros controles comerciales Precinor y Precipath los que son tratados en las mismas condiciones que las muestras.
- ✧ En ausencia de sueros controles comerciales se utiliza un pool de sueros normales obtenidos del banco de sangre procesados en nuestro departamento al que se le calcula la media, desviación estándar y se obtiene el intervalo de confianza así como el coeficiente en variaciones de rutina el cuál debe ser menor del 5 %.

#### Valores de referencia:

<i>Valores</i>	<i>Hombres</i>	<i>Mujeres</i>
-Normales	$\geq 35$ mg/dL $\geq 0,90$ mMol/L	$\geq 45$ mg/dL
-De riesgo	31-34 mg/dL	41-44 mg/dL
-Patológicos	$\leq 30$ mg/dL $<0,90$ mMol/L	$\leq 40$ mg/dL

- ***Determinación de VLDL-colesterol***

#### Fundamento del método

- ✧ Método indirecto por cálculo mediante la expresión:

$$\text{VLDL} = \frac{\text{Triglicéridos}}{2,2}$$

#### Informe de los resultados.

- ✧ Los resultados serán anotados en la lista de trabajo y luego serán introducidos en la computadora en el programa **GALEN** al cual pueden acceder los médicos y el departamento de entrega de resultados para obtener los mismos.

#### Valores de referencia:

Valores normales:  $\leq 1,04$  mMol/L  
Valores patológicos:  $>1,04$  mMol/L

#### **Determinación de LDL -colesterol**

#### Fundamento del método:

- ✧ Método indirecto por cálculo mediante la fórmula de Friedewald:

LDL-colesterol =	$\frac{\text{Colesterol total} - \text{HDL-colesterol} - \text{triglicéridos}}{2,2}$
------------------	--

Informe de los resultados.

- ✧ Los resultados serán anotados en la lista de trabajo y luego serán introducidos en la computadora en el programa **GALEN** al cual pueden acceder los médicos y el departamento de entrega de resultados para obtener los mismos.

Valores referencia:

<i>Valores</i>	<i>Paciente</i>
Normales	$\leq 130 \text{ mg/dL}$ o $\leq 3,84 \text{ mMol/L}$
De riesgo	131-159 mg/dL
Patológicos	$\geq 160 \text{ mg/dL}$ o $\geq 3,84 \text{ mMol/L}$

- **Electroforesis de lipoproteínas**

Fundamento del método:

- ✧ Las lipoproteínas séricas cuando se someten a acción de un campo eléctrico migran separándose según punto isoeléctrico en 3 bandas visibles.

Reactivos químicos

- ✧ Agarosa
- ✧ Tris
- ✧ Dietil barbitúrico
- ✧ Lactato de calcio
- ✧ NaN<sub>3</sub>
- ✧ Sudán Negro B
- ✧ Etilenglicol

Utensilios y aparatos de medición

- ✧ Tubos de 12 x 75 mm
- ✧ Matraz aforado de 500 mL
- ✧ Balanza analítica
- ✧ Espátula
- ✧ Copillas para muestras

- ✧ Gradillas de plásticas
- ✧ Papel de filtro
- ✧ Lápiz cristalográfico
- ✧ Pipetas automáticas de 10, 50, 100  $\mu\text{L}$
- ✧ Placa de vidrio
- ✧ Aguja 26
- ✧ Marcador de posillos
- ✧ Cocina
- ✧ Beaker de cristal
- ✧ Cubeta electroforética
- ✧ Fuente de poder
- ✧ Baño de María refrigerado con sistema circulante
- ✧ Puntas amarillas

#### Preparación de los Reactivos

- ✧ Buffer Tris-lactato-barbiturato pH 8.6

Tris -----	4.43 g
Ácido dietil barbitúrico -----	2.24 g
Lactato de calcio -----	0.053 g
NAN3 -----	0.065 g
H <sub>2</sub> O destilada c.s.p. -----	500 mL

*Nota: Antes de enrasar a 500 mL medir el pH 8.6, luego enrasar con H<sub>2</sub>O destilada a 500 mL.*

- ✧ Agarosa 0.7 %

Agarosa para electroforesis -----	0.7 g
BSA -----	0.2 g
Buffer TLB -----	100 mL

*Nota: Mezclar y diluir colocando el beaker a 100 °C*

*Mantener la agarosa disuelta a 60 °C.*

*Alicuotar 8-10.5 mL en tubos de ensayo y guardar en refrigerador a 8 °C*

- ✧ Colorante sudan negro B 0.65 %

Sudan Negro B -----	650 mg
Etilenglicol -----	100 mL

Muestra:

- ✧ Suero no hemolizado.
- ✧ Conservación: estable durante 3 meses en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$   
Estable durante 7 días a  $4^{\circ}\text{C}$

#### Procedimiento

- ✧ Disolver la agarosa y verterla sobre una placa de vidrio colocada a nivel para evitar el derrame de la misma.
- ✧ Secar la placa en el refrigerador a  $8^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos.
- ✧ Retirar la placa, colocarla en la cubeta electroforética.
- ✧ Abrir los posillos con el marcador y retirar la película de agarosa cortada con la aguja.
- ✧ Establecer las condiciones de corrida con 200 V y 30 mA
- ✧ Cerrar la tapa de la cubeta y estabilizar durante 5 minutos.
- ✧ Buscar las muestras a procesar en el departamento de recepción y procesamiento de muestras según la lista de trabajo.
- ✧ En un tubo de ensayo colocado en un *beaker* a  $60^{\circ}\text{C}$  depositar 100  $\mu\text{L}$  de muestra, 50  $\mu\text{L}$  del colorante SN y 100  $\mu\text{L}$  de agarosa líquida y mezclar.
- ✧ Tomar 10  $\mu\text{L}$  de esta mezcla y depositarla en el posillo.
- ✧ Repetir los pasos 7 y 8 para cada muestra.
- ✧ Cerrar la tapa de la cubeta y programar el tiempo de corrida para 40 min.
- ✧ Al sonar la señal retirar la placa.
- ✧ Colocarla sobre un papel de filtro y realizar la interpretación por observación comparativa contra la tabla de patrones establecidos, para la clasificación.

*Nota: La placa muestra la separación de la muestra en tres bandas*

- ✧ *Beta (VLDL)*
- ✧ *Probeta (LDL)*
- ✧ *Alfa (HDL)*

(En el punto de aplicación quedan los quilomicrones)

#### Informe de los resultados

- ✧ Los resultados serán anotados en la lista de trabajo y luego serán introducidos en la computadora en el programa **GALEN** al cual pueden acceder los médicos y el departamento de entrega de resultados para obtener los mismos.

#### Control de calidad

- ✧ Se monta un suero normal en cada placa.
- ✧ Valores de referencia: Normal.