



“Determinaciones Bioquímicas Preliminares en Muestras Sanguíneas de Caninos en un Centro de Atención Médica Veterinaria”

Autor principal: Guzman-Campos Ana Elisa
Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Departamento de Ingeniería
Bioquímica,
eloguzman32@gmail.com

Asesor: Alejo-Iturvide Francisco
Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Departamento de
Licenciatura en Biología,
fralejo04@gmail.com

Coasesor: Márquez-Lucio Ma Azucena
Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Departamento de Ingeniería
Bioquímica,
Zucet01@gmail.com

Resumen

En el siguiente documento se muestra la propuesta de un método espectrofotométrico sencillo y económico para la cuantificación de 4 parámetros bioquímicos: Colesterol, Albumina, Magnesio y Calcio en suero sanguíneo canino. Además, se presenta el análisis de influencia de errores técnicos, analíticos e informáticos presentes durante los ensayos preliminares de cuantificación en el laboratorio de Bioquímica Clínica Veterinaria de la Estación Biológica del Instituto Tecnológico Superior de Irapuato (ITESI). En esta primera fase de evaluación analítica, se adquirieron y analizaron muestras sanguíneas de caninos de distintas razas y tamaños provenientes del Centro de Atención Médica Veterinaria en Irapuato, las cuales fueron obtenidas por personal certificado del propio centro para realizar las respectivas flebotomías. Los resultados indican que el método aún necesita ser ajustado con la realización de más evaluaciones experimentales que permitan obtener un protocolo confiable para una posterior verificación y validación de precisión en la producción de resultados de análisis clínicos.



Introducción

Las enfermedades contagiosas provenientes de los animales juegan un papel importante en la mayoría de los sectores de medicina veterinaria, en particular a la luz de pérdidas económicas infligidas por tales enfermedades (OIE, 1996). Asimismo los objetivos de los laboratorios veterinarios estatales y nacionales que suelen ser considerados los más importantes del país; están enfocados principalmente en la mejora de las metodologías de diagnóstico, a través de la prevención de la presencia de errores técnicos y analíticos (Shultze & Irizarry, 2017). Un primer punto para considerar durante la selección y utilización de un método alternativo de trabajo de laboratorio; es sin duda la evaluación de los recursos existentes en los mismos, para determinar si es factible la utilización del protocolo de interés en base a los recursos disponibles para su ejecución. Para esto, con el fin de reducir la influencia negativa de errores técnicos durante los ensayos de medición es altamente recomendable tener un periodo de familiarización con la ejecución de cada método y con los materiales de laboratorio a usar, para que con ello se asegure que los resultados producidos durante la fase analítica puedan ofrecer información confiable sobre el estado clínico del paciente (Brambila, 2007).

Objetivos

- Realizar pruebas preliminares con la técnica analítica propuesta con la finalidad de resguardar la confiabilidad de las mediciones obtenidas.
- Identificar los errores técnicos presentes en las fases del pre, procesamiento y post análisis de los analitos bioquímicos.
- Realizar ensayos de exámenes analíticos con sus respectivas reproducciones con el fin de generar valores de referencia.
- Analizar e interpretar los valores obtenidos.

Justificación



El uso de los análisis de bioquímica clínica, brinda datos de mucha utilidad para evaluar el estado de salud de animales silvestres y domésticos bajo condiciones de cautiverio, siendo además importante para confirmar o descartar un diagnóstico presuntivo incorrecto, evaluar la mejor opción de terapia y el poder pronosticar la enfermedad que se está desarrollando (del Sagrado Corazón Cea-Bonilla, Hernández- Espinosa, Salazar Morales, Soto Briseño, & Matuz Mares, 2014). Así mismo, los análisis bioquímicos constituyen una herramienta complementaria para la determinación de desbalances metabólicos, nutricionales, enfermedades subclínicas a nivel de un solo sujeto de investigación o bien una población silvestre. Los parámetros de referencia preestablecidos son la guía inicial para interpretación de resultados de individuos bajo análisis, además sirven también como referencia para verificar si la determinación está dentro de los rangos que están definidos como normales e ideales (Fuentes, y otros, 2012).

Con el fin de iniciar los trabajos de cuantificación de parámetros bioquímicos y garantizar la reproducibilidad de los datos generados, se realizaron una serie de ensayos en el laboratorio de Bioquímica Clínica Veterinaria en la Estación Biológica de la licenciatura en Biología del ITES. Para ello se siguieron protocolos para el manejo de las muestras y se adaptaron a las condiciones de infraestructura física y técnica del laboratorio. Se espera que los resultados de este estudio sean los primeros valores de referencia que se pueden utilizar para caracterizar clínicamente varias especies animales.

Es importante señalar que el presente estudio está centrado únicamente en el análisis de las muestras sanguíneas, mismas que fueron proporcionadas por un centro de atención veterinario por que los datos así como la información respecto de la identidad de los pacientes son de manejo exclusivo del centro veterinario.

Metodología

Fase preliminar

Esta fase consistió en el montaje de equipos y establecimiento de protocolos de pre y procesamiento de las muestras sanguíneas así como de los ensayos analíticos. El primer paso fue la adecuación de un área específica dentro de la



Estación Biológica de la licenciatura de biológica del ITESI para el establecimiento de los equipos como espectrofotómetro UV-Vis, analizador bioquímico, hematológico, material volumétrico y kits de reactivos para análisis de parámetros bioquímico – clínico, necesarios para realizar las determinaciones analíticas en las muestras. El procesamiento de las muestras para cada determinación se llevó a cabo de acuerdo las indicaciones de las hojas de seguridad de los reactivos de la marca Spinreact.

Pruebas preliminares

En esta fase se obtuvieron los datos y realizaron los respectivos cálculos para determinar la concentración de los distintos analitos de interés. Una vez finalizadas las lecturas correspondientes de acuerdo con las instrucciones del fabricante se procedió a la cuantificación y revisión para evaluar la robustez de la metodología y determinar si los datos obtenidos son coincidentes con los esperados (Tabla 1).

Análisis estadístico de los datos obtenidos:

Una vez que fueron identificados los errores operativos y técnicos en las pruebas preliminares, se procedió con los ensayos analíticos por triplicado con el fin de estimar la precisión y exactitud del método cuantitativo utilizado para generar datos bioquímico – clínicos, los cuales pueden ser utilizados como referencia para posteriores determinaciones que puedan solventar la veracidad de los resultados obtenidos.

Resultados y discusión

En la Tabla 1 se presentan los resultados de los valores obtenidos durante la prueba preliminar de los ensayos de determinación de los parámetros bioquímicos seleccionados a estudiar, los cuales fueron comparados con rangos de referencia ya establecidos de un laboratorio europeo que en sus trabajos publicados de investigación utilizó una metodología similar a la propuesta en el presente proyecto con el cual se hizo una comparación numérica y se observó que en esta etapa de familiarización y realización de pruebas preliminares los datos producidos



durante estos ensayos de cuantificación proveían una demostración del que el protocolo resultaba viable y era expuesto a una mejora continua para su posterior verificación y certificación.



Tabla 1. Valores de concentraciones obtenidas de los parámetros bioquímicos estudiados en 30 muestras sanguíneas de caninos.

Muestra	Chol(mg/dL)	Alb(g/L)	Mg(meq/L)	Ca (mg/dL)
1	148.78	2.88	2.98	13.45
2	155.1	3.05	1.96	11.9
3	157.14	4.1	0.56	15.01
4	159.18	2.11	0.68	12.87
5	163.26	3.37	1.9	12.98
6	144.89	0.101	2.14	13.67
7	162.89	2.56	2.09	13.11
8	167.13	4.56	2.39	6.19
9	176.67	4.64	2.3	1.83
10	187.63	4.67	2.24	2.02
11	189.39	5.03	3.85	3.87
12	175.97	4.66	4.46	3.23
13	183.39	4.62	2.003	2.96
14	142.76	4.8	2.56	3.5
15	104.96	4.3	1.88	8.25
16	139.52	3.38	1.68	8.35
17	153.92	4.24	1.82	5.5
18	179.52	4.32	2.05	6.34
19	82.24	3.73	2.5	10.15
20	187.2	4.19	2.21	10.79
21	228.91	3.06	2.31	13.43
22	176.5	2.98	2.27	12.51
23	295.18	3.71	2.19	14.01
24	236.14	2.56	2.2	15
25	237.34	3.16	2.75	15.26
26	195.78	2.18	2.44	14.37
27	104.81	2.95	2.68	13.13
28	268.07	3.73	2.57	18.13
29	167.46	2.95	2.62	15.13
30	239.15	2.85	2.64	19.7
*I.R en caninos	0.2-0.4	2.3 -3.8	1.4-2.8	9.2-13

*Chol= Colesterol *Ca= Calcio *Alb= Albumina *I.R= Intervalos de referencia Mg= Magnesio

La información mostrada en la Tabla 1 indica que existe una variación entre los valores obtenidos respecto de los rangos de referencia consultados en la literatura (DIAP, 2014). Es posible que las diferencias observadas se deban a errores técnicos y analíticos que no pudieron ser identificados durante los ensayos preliminares, las cuales de acuerdo con la literatura podrían estar relacionados con el control de limpieza y esterilización del material de laboratorio (puntillas de



micropipeta, celda desechable para lectura espectrofotométrica) (Gil, Franco, & Galban, 2016), además de posibles aspectos relacionados con la calibración de los instrumentos, o a la influencia de algún error informático en el sistema operativo del espectro mencionado anteriormente (Carrion, Garcia, & Suarez, 2015).

Robustez analítica.

Se realizaron determinaciones analíticas con 3 réplicas para evaluar la reproductibilidad y repetitividad de 9 muestras sanguíneas con el fin de establecer precisión y exactitud además de comparación con los valores de referencia (Tabla 2,3,4 y 5).

Tabla 2. Valores de concentración de Colesterol en las muestras sanguíneas.

Colesterol						
Muestra	C1	C2	C3	Cálculo de media	D.S reproducciones	%De varianza de exactitud
31	193.644489	194.240318	194.438928	194.1079113	0.413439126	0.029460444
32	188.679245	188.679245	188.877855	188.7454485	0.114667382	0.056272757
33	171.201589	171.797418	171.996028	171.6650116	0.413439126	0.141674942
34	175.968222	177.159881	177.358491	176.8288646	0.751924309	0.115855677
35	182.919563	183.515392	183.912612	183.449189	0.499823531	0.082754055
36	188.083416	188.083416	188.480636	188.2158226	0.229334764	0.058920887
37	217.676266	216.881827	217.080437	217.2128434	0.413439126	-0.086064217
38	217.676266	216.881827	217.080437	217.2128434	0.413439126	-0.086064217
39	140.8143	141.01291	141.410129	141.0791129	0.303381377	0.294604436

**Tabla 3 Valores de concentración de Albúmina en muestras sanguíneas**

Albumina						
muestra	C1	C2	C3	Cálculo de Media	D.S	%De varianza de exactitud
31	1.05582524	1.09223301	1.11650485	1.088187702	0.030541401	0.78236246
32	0.80097087	0.41262136	0.40048544	0.53802589	0.227797868	0.89239482
33	2.14805825	2.18446602	2.23300971	2.188511327	0.042619959	0.56229773
34	2.12378641	2.13592233	2.1723301	2.144012945	0.025262937	0.57119741
35	3.82281553	3.83495146	3.83495146	3.830906149	0.007006678	0.23381877
36	1.80825243	1.82038835	1.83252427	1.82038835	0.012135922	0.63592233
37	2.33009709	2.34223301	2.36650485	2.346278317	0.018537928	0.53074434
38	3.27669903	3.28883495	3.3131068	3.292880259	0.018537928	0.34142395
39	3.09466019	3.10679612	3.11893204	3.106796117	0.012135922	0.37864078

Tabla 4 Valores de concentración de Magnesio obtenidas en las reproducciones de las muestras sanguíneas

Magnesio						
Muestra	C1	C2	C3	Cálculo de Media	D.S reproducciones	%De varianza de exactitud
31	1.97887324	1.98591549	2	1.988262911	0.01075722	0.005868545
32	2.02816901	2.04225352	2.04225352	2.037558685	0.008131694	-0.018779343
33	2.17605634	2.18309859	2.19014085	2.183098592	0.007042254	-0.091549296
34	1.92253521	1.93661972	1.94366197	1.9342723	0.01075722	0.03286385
35	2.1971831	2.20422535	2.21126761	2.204225352	0.007042254	-0.102112676
36	2.11267606	2.11971831	2.12676056	2.11971831	0.007042254	-0.059859155
37	1.95070423	1.96478873	1.97183099	1.962441315	0.01075722	0.018779343
38	1.9084507	1.92253521	1.92957746	1.920187793	0.01075722	0.039906103
39	2.31690141	2.32394366	2.32394366	2.321596244	0.004065847	-0.160798122



Tabla 5 Valores de concentración de Calcio obtenidas en las reproducciones de las muestras sanguíneas

Calcio						
muestra	C1	C2	C3	Cálculo de Media	D.S de las reproducciones	%De varianza de exactitud
31	5.42207792	5.68181818	5.64935065	5.584415584	0.141522693	0.44155844
32	1.2012987	1.26623377	1.33116883	1.266233766	0.064935065	0.87337662
33	6.49350649	6.75324675	6.81818182	6.688311688	0.171802033	0.33116883
34	10.6168831	11.461039	10.8441558	10.97402597	0.436805976	-0.0974026
35	10.3896104	10.487013	10.487013	10.45454545	0.056235416	-0.0454545
36	9.51298701	9.57792208	9.57792208	9.556277056	0.037490277	-0.0443722
37	11.4935065	11.7207792	11.7207792	11.64502165	0.13121597	-0.1645021
38	11.4935065	11.5909091	11.5909091	11.55844156	0.056235416	-0.1558441
39	9.35064935	9.77272727	9.77272727	9.632034632	0.243686802	0.03679654

Para efectos de este trabajo de investigación se decidió realizar los primeros ensayos repetitivos para determinar la varianza estadística en cuanto a la precisión y exactitud, observándose una diferencia numérica no tan significativa en los valores de cálculo de concentración de los parámetros bioquímicos albumina, colesterol, magnesio y calcio es las repeticiones de los ensayos experimentales de cuantificación, dando pauta a que dichos datos podían ser considerados como confiables y útiles ya que estos se acercaban al valor esperado de dicho metabolito al contenido en sustancias patrón comerciales, que regularmente son utilizadas en las verificaciones de los métodos analíticos de los laboratorios para que estos generen y certifiquen sus procedimientos de bioquímica analítica clínica. Analizando e interpretando las variaciones de los valores presentados en las Tablas 2,3,4 y 5, se deduce que el método experimental empleado es reproducible ya que analizando estadísticamente la precisión y la exactitud en los datos bioquímico - clínicos obtenidos durante las repeticiones de la muestras de los ensayos indican que éste es considerablemente preciso pero no exacto, atribuible quizá a las condiciones ambientales y técnicas a las que fueron expuestas las distintas muestras (Velandia, Peña, & Palacios, 2011)



Conclusión

En conclusión, el método es analíticamente reproducible ya que los datos clínicos obtenidos durante los ensayos de medición arrojaron buen grado de precisión en las muestras sanguíneas, por lo que se recomienda mejorar y establecer un adecuado registro y control de la condiciones medición a las que serán sometidas futuras muestras con el fin de mejorar el grado de exactitud y precisión del método y que pueda ser utilizado en las actividades del laboratorio rutinario para el que fue propuesto.



Referencias

- Brambila, E. (2007). *Validacion y verificacion de Sistemas de Medicion el laboratorio Clinico*. Mexico. Obtenido de <https://www.ifcc.org/media/216093/Validacion.pdf>
- Carrion, I., Garcia, L., & Suarez, Y. (2015). Validacion del método enzimático para la determinación de creatinina en suero y orina. *Scielo*. Obtenido de [php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152015000400003](http://scielo.org/php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152015000400003)
- Ceron Madrigal, J. J. (2015). *Análisis clínicos en pequeños animales*. Buenos Aires: Intermedica Editorial.
- del Sagrado Corazon Cea-Bonilla, M. A., Hernandez- Espinosa, D. R., Salazar Morales, M. F., Soto Briseño, I. A., & Matuz Mares, D. (2014). El uso de escenarios clínicos y el aprendizaje de la Bioquímica en alumnos de primer año de la Carrera de Medicina The use of clinical scenarios and learning of biochemistry in first year students of Medicine. *El servir*, 187-192.
- DIAP. (2014). *Valores de referencia para el diagnostico en animales pequeños*. España. Obtenido de <http://www.diap.com.ar/>
- Fuentes, G., Diaz, P., Hernandez, R., Cervantes, D., Presno, J. M., & Alcantara, L. (2012). Determinación de intervalos de referencia para química clínica en población mexicana. *Latinoamer Patologia Clinica*, 43-51. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2013/pt131e.pdf>
- Gil, P., Franco, M., & Galban, G. (2016). *Evaluacion de errores preanaliticos en el laboratorio de planta del HIGA O, Alende de MAR de plata*. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/535/53549173015.pdf>
- IICA. (1989). *Patologia Clinica Veterinaria*. Rilsa.
- OIE, O. (1996). *Manual of standards for diagnostic test and vacciones*. 1996: OIE editorial.



Shultze, A., & Irizarry, A. (2017). Reconozing and Reducing Analytical Errors and Sources of variation in Clinical Pathology. *Rev of Toxicologic Pathology*, 281-287.

Velandia, C., Peña, V., & Palacios, A. (2011). Validacion del método analítico para la cuantificacion de Bacitracina. *Revista Cubana de Farmacia*, 216-225.