

Material Didáctico de Enzimología para los Laboratorios Biomédicos.



Colectivo de autores

MsC. Lázaro Díaz Melgarejo
Esp. Darcia Elena Carrete Aties
MsC. Leticia Salinas Ojeda
Dr. Annia Robaina Flores
Dr. C. Madelyn Fernández Barrio

INDICE

Epígrafe Contenido

PRESENTACIÓN

CAPÍTULO 1 LAS ENZIMAS COMO BIOCATALIZADORES. CARACTERÍSTICAS QUE FUNDAMENTAN SU USO EN EL LABORATORIO

Biocatalizadores o catalizadores biológicos

Origen y evolución de la enzima

Estructura de la enzima

Propiedades de la enzima

Cofactores enzimáticos

Nomenclatura enzimática

Clasificación enzimática

Mecanismo básico de acción enzimática

Cinética enzimática

Efectos de la concentración de la enzima.

Efecto de la concentración de sustrato

Efecto de la concentración de cofactores

Efecto de la concentración de iones H^+ (pH)

Efecto de la temperatura

Presencia de activadores

Presencia de inhibidores

Efecto de las enzimas reguladoras

Ejercicios de comprobación del capítulo 1

CAPITULO 2. USO DE LAS ENZIMAS EN LOS LABORATORIOS BIOMÉDICO

Las enzimas como medio de diagnóstico o índice de enfermedad.

Enzimas como Medio de Diagnostico en el laboratorio clínico

Enzima Amilasa

Enzima Transaminasa (TGO/ASAT)

Enzima Transaminasa (TGP/ALAT)

Enzima Deshidrogenasa Láctica

Enzima Gamma Glutamil Transferasa (GGT)

Enzima Creatina quinasa (CK)

Enzima Creatina quinasa Isoenzima MB.

Enzima Fosfatasa Alcalina (ALP)

Enzima Fosfatasa Ácida

**Enzimas como medio de diagnóstico en el laboratorio de anatomía
patológica**

Enzimas Fosfatasa Ácida

Deshidrogenasa

Peroxidasa

Enzimas como Medio de Diagnóstico en el laboratorio de microbiología

Enzima Beta hemolisina estafilococica (beta-lisina)

Enzima Fosfolipasa D (PLD)

Enzimas Catalasa y Peroxidasa.

Enzima Coagulasa

Enzima Ureasa

Enzima Oxidasa

Enzima Fosfatasa

Ejercicios de comprobación del capítulo 2. Tema 2.1

Enzimas como Herramientas de trabajo en el laboratorio clínico

Enzima Glucosa-Oxidasa

Enzima Lipoproteína-lipasa (LPL)

Enzima Colesterol Esterasa.

Enzima Ureasa

Enzima Creatinasa

Enzima Uricasa

Enzimas como herramientas de trabajo en el laboratorio de anatomía patológica

Enzima a Amilasa

Enzimas como herramientas de trabajo en el laboratorio de microbiología

Definiciones importantes

Técnicas inmunoenzimáticas

Tipos de enzimoensayos

Sistema Ultra Micro Analítico (SUMA)

Componentes de la tecnología SUMA

Aplicaciones de la tecnología SUMA

Algunos de los exámenes más frecuentes en laboratorio de SUMA

Ejemplos de la aplicación de SUMA en el control epidemiológico

Precauciones en la utilización de la tecnología SUMA

Recomendaciones para lograr mejores resultados

Perspectivas de la Tecnología SUMA

Ejercicios de comprobación del capítulo 2. Tema 2.2

Bibliografía

Anexo 1.

Respuesta de los ejercicios de comprobación del Capítulo 1 y Capítulo 2

Presentación

La competencia en la sabiduría promovido por la ciencia y la técnica en la época actual, exige la formación de profesionales con mejor calidad, capaces de dar respuestas efectivas a los problemas que la sociedad contemporánea plantea en su desarrollo de lo cual no están exentas las condiciones sociales cubanas, caracterizadas por la construcción y el perfeccionamiento del socialismo, enmarcada en la Batalla de Ideas que libra nuestro pueblo en pos de la cultura general integral masiva suscitada. En medio de ello el egresado de la licenciatura en Tecnología de la Salud en Bioanálisis Clínico debe fundamentar e interpretar los resultados de los procedimientos técnicos utilizados en la práctica para el estudio integral del proceso salud-enfermedad; constituyendo los contenidos relacionados con el uso de la enzima en los laboratorios biomédicos de los de vital interés pues son numerosas las patologías que gracias a los adelantos tecnológicos de la práctica médica pueden ser diagnosticadas mediante el uso de métodos enzimáticos los cuales por su precisión garantizan la confiabilidad de los resultados obtenidos que hasta hace unas décadas se basaban más en el diagnóstico clínico convencional por no contar con el apoyo tecnológico actual.

Los primeros intentos de medir moléculas de interés médico en los fluidos biológicos, datan de la década del 40 del siglo XX, y concernieron principalmente a metabolitos tales como glucosa, urea y enzimas, ya que estas podían transformar muchas moléculas de sustrato. Por su especificidad las enzimas son utilizadas en el laboratorio como medio de diagnóstico y como herramienta de trabajo siendo estudiadas por la enzimología clínica. La enzimología clínica evidentemente ha proporcionado el desarrollo de los medios de diagnóstico, prevención, control y el tratamiento de múltiples enfermedades que han afectado la humanidad, constituyendo una pieza clave los estudios de la bioquímica para la elaboración de nuevos fármacos, diagnosticadores y técnicas de detección precoz de enfermedades metabólicas, hereditarias y las de carácter transmisible con vista a llegar a la excelencia de los servicios sanitarios portadores de técnicas menos invasivas al paciente. Dado que las perspectivas y la visión en desafíos futuros del desarrollo científico-técnico indican que el diagnóstico a tiempo y acertado constituye un golpe anticipado a los trastornos causantes de las patologías que afectan la salud humana; se requiere que el profesional en Bioanálisis Clínico sepa fundamentar e interpretar los resultados de los procedimientos técnicos utilizados en la práctica para el estudio integral del proceso salud-enfermedad siendo necesario entonces que este se apropie del conocimiento de la

enzimología Clínica. Para potenciar ello es que se confecciona el siguiente Material Didáctico sobre el Uso de la Enzima en los Laboratorios Biomédicos.

Al estudiante de la licenciatura en Bioanálisis Clínico.

Quizás te preguntaras ¿cómo se puede «digerir» lo que parece constituir un sinnúmero de datos?. A primera vista, el éxito en el estudio de la enzimología clínica podría depender de la capacidad de memorizar, esto es un elemento importante de cualquier disciplina médica, pero la comprensión de los principios y técnicas básicas y la elaboración de un sistema para almacenar esta información desempeñan una destacada función en el dominio de las ciencias médicas.

Sugerimos entonces que el estudiante se concentre en aprender los datos más importantes pensando como lo haría un bioanalista sin dejarse de plantear interrogantes básicas: ¿quién?, ¿dónde? cuándo?, ¿por qué?, ¿cuáles?, ¿qué?, y ¿cómo?

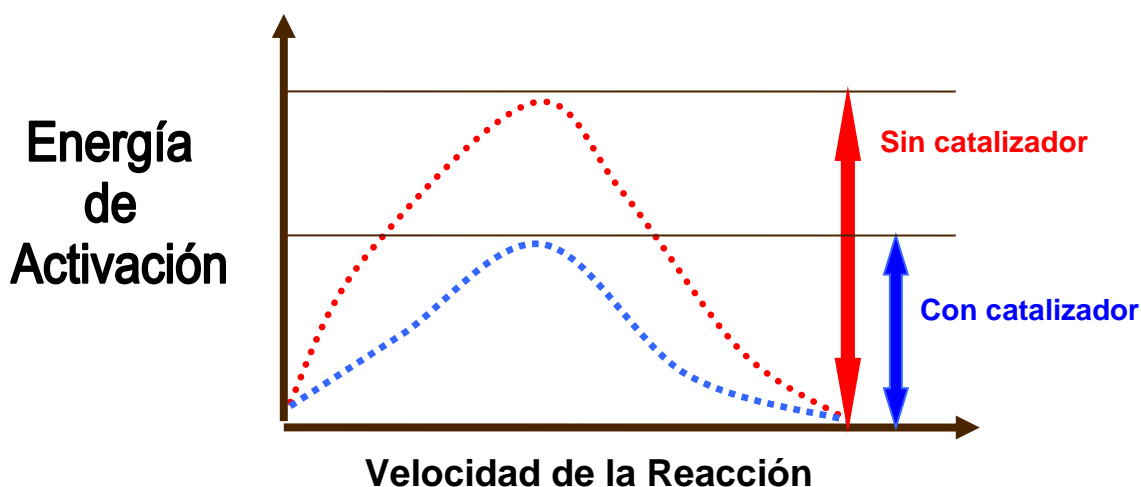
CAPÍTULO 1. LAS ENZIMAS COMO BIOCATALIZADORES: CARACTERÍSTICAS QUE FUNDAMENTAN SU USO EN EL LABORATORIO

1.1. Biocatalizadores o catalizadores biológicos

Los **catalizadores** son sustancias que tienen la capacidad de disminuir la energía de activación de la reacción química con lo cual aumentan su velocidad.

En condiciones biológicamente significativas las reacciones sin catalizar tienden a ser lentas. La acción de un catalizador facilita el desenvolvimiento de las transformaciones químicas; acelerando considerablemente la velocidad de la reacción química y disminuyendo la energía de activación, entendida esta como la energía necesaria para que se produzcan choque efectivos entre los reaccionantes y su orientación para obtener el producto (figura 1.4) sin variar la constante de equilibrio

Figura 1.4. Representación de comportamiento de la energía utilizada en el curso de la reacción con y sin catalizador



Los catalizadores pueden clasificarse en bióticos y abióticos. Los abióticos son aquellos que su función es independiente de los seres vivos y pueden ser metales como el Pt, sales como el $K_2Cr_2O_7$, ácidos o bases como el H_2SO_4 o el NaOH, compuestos orgánicos como el fenol, el anhídrido acético etc. Los bióticos son aquellos que realizan su función en los seres vivos. También denominados biocatalizadores representados por la enzima cuya naturaleza es proteica con la excepción de un pequeño grupo de ARN y anticuerpos con actividad catalítica, denominados ribozimas y abzymas respectivamente.

La mayoría de las actividades de la **Ribozima**(ARN con acción catalítica) se basan en dos reacciones fundamentales: transesterificación e hidrólisis de enlaces fosfodiéster. Algunas ribozimas intervienen en importantes reacciones celulares como el procesamiento o maduración del ARN y la síntesis de proteínas (molécula del ARNr componente del ribosoma encargada de catalizar la transeptidación o unión de los aminoácidos). Otras como la ARN polimerasa sintetiza una cadena de ARN complementaria a un molde de ADN. Estas representan una importante herramienta biotecnológica para degradar ARN específicos facilitándose así su manipulación; como las ribozimas tienen la capacidad de auto procesamiento, es decir, de auto eliminarse se está estudiando la posibilidad de proteger al organismo humano de virus, bacterias y hongos patógenos a partir de la eliminación de su ARN específicamente. En el caso de la **abzimas** (anticuerpos con actividad catalítica) los anticuerpos(inmunoglobulina) son componentes clave de la respuesta inmune. Una molécula o grupo químico que se fija fuerte y específicamente a un anticuerpo determinado se denomina antígeno. Cuando se utiliza un análogo del estado de transición como antígeno para estimular la producción de anticuerpos, los anticuerpos que lo fijan serán catalizadores potenciales de la reacción correspondiente, este enfoque sugerido en 1969 por W.P.Jencks se ha podido experimentar con técnicas de laboratorio para la producción de anticuerpos monoclonales que son todos iguales y que fijan un anticuerpo específico. Las abzimas son en su mayoría constructos artificiales, estas pueden encontrarse en los organismos, como es el caso de los autoanticuerpos antipéptido vasoactivo intestinal y en el caso del lupus eritematoso en el que los anticuerpos se pueden unir al ADN e hidrolizarlo. Las abzimas son potenciales herramientas de la biotecnología a partir de las cuales se realizan determinadas manipulaciones en el ADN.

Mientras que las **enzimas** se definen como catalizadores biológicos de naturaleza proteica, que se encuentran en todos los tejidos de los organismos vivos, y que facilitan las reacciones químicas necesarias para el mantenimiento de la vida interviniendo en las reacciones metabólicas modificando su velocidad. Estas moléculas son responsables de la dirección de la compleja red de reacciones químicas celulares llevadas a cabo en los organismos vivos.

Respecto a su aplicación en la biotecnología, algunas enzimas se utilizan con fines médicos, ya sea como medio de diagnóstico o índice de enfermedad y como herramienta de trabajo o reactivos químicos en diversos laboratorios para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de diversas enfermedades.

En los últimos años, la investigación sobre la química enzimática ha permitido aclarar algunas de las funciones vitales más básicas. La ribonucleasa, una enzima descubierta en 1938 por el bacteriólogo estadounidense René Jules Dubos y aislada en 1946 por el químico estadounidense Moses Kunitz, fue sintetizada por científicos estadounidenses en 1969. La síntesis consiste en unir 124 moléculas de aminoácidos en una secuencia muy específica para formar la macromolécula.

Dicha síntesis permitió identificar aquellas áreas de la molécula que son responsables de sus funciones químicas, e hizo posible crear enzimas especializadas con propiedades de las que carecen las sustancias naturales. Este potencial se ha visto ampliado durante los últimos años por las técnicas de ingeniería genética que han hecho posible la producción de algunas enzimas en grandes cantidades que son útiles en el tratamiento médico de zonas de inflamación local como la tripsina, la α quimotripsina y la desoxirribonucleasa útiles para la eliminación de sustancias extrañas y tejido muerto en el tratamiento de abscesos, quemaduras, úlceras infestadas de la piel y cervicitis; las dextrinasas que previenen la caída de los dientes; la L-asparaginasa utilizada en el tratamiento de la leucemia para deprimir los niveles de asparagina, aminoácido que requieren las células tumorales en grandes cantidades para su crecimiento; la estreptoquinasa obtenida a partir de *Streptococo hemolítico* o por ingeniería genética capaz de disolver el coágulo en el músculo cardíaco creado a consecuencia de un infarto, inactivando el plasminógeno, precursor de la plasmina; transformándose de este modo la fibrina en péptidos solubles. Por otro lado algunas enzimas como la β galactocidasa son utilizadas como reactivos fijados a una matriz (alimento) para evitar la incidencia negativa de algunos alimentos, es el caso de la leche que presenta lactosa, disacárido al cual muchos niños son intolerantes, siendo capaz la β galactocidasa de disminuir los niveles de este en la leche.

Por otra parte el proceso de producción en muchas industrias depende de la acción de enzimas sintetizadas por las levaduras y bacterias.

Orígenes y evolución de las enzimas

Las enzimas fueron descubiertas en la levadura, que fermentaban los azúcares para producir el alcohol, hacia 1850 por Louis Pasteur; producto de ello. Se conocían antiguamente como fermentos. El nombre de enzima, que fue propuesto en 1867 por el fisiólogo alemán Wilhelm Kühne (1837-1900), deriva de la frase griega en *zymē*, que significa 'en fermento'. En la actualidad los tipos de enzimas identificados son más de 2.000.

Sin duda la fermentación alcohólica es la reacción enzimática más antigua conocida. Se creía que este fenómeno y otros similares eran reacciones espontáneas hasta que en 1857 el químico francés Louis Pasteur comprobó que la fermentación sólo ocurre en presencia de células vivas. Sin embargo, el químico alemán Eduard Buchner descubrió en 1897 que un extracto de levadura libre de células puede producir fermentación alcohólica. La antigua incógnita fue entonces

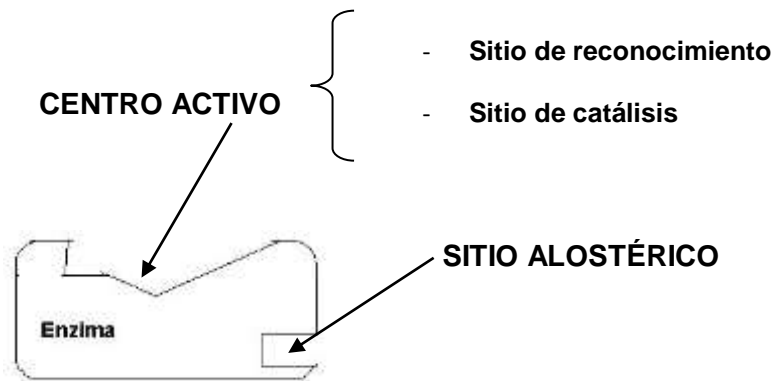
resuelta; la levadura produce la enzima y ésta lleva a cabo la fermentación. Ya en 1783 el biólogo italiano Lazzaro Spallanzani había observado que la carne podía ser digerida por jugos gástricos extraídos de halcones. Éste fue el primer experimento en el que se llevó a cabo una reacción vital fuera de los organismos vivos. Tras el descubrimiento de Buchner, los científicos asumieron que, en general, las fermentaciones y las reacciones vitales eran producidas por enzimas. Sin embargo, todos los intentos de aislar e identificar su naturaleza química fracasaron. Más tarde, en 1926, el bioquímico estadounidense James B. Sumner consiguió aislar y cristalizar la ureasa. Cuatro años después su colega John Howard Northrop aisló y cristalizó la pepsina y la tripsina. Northrop demostró también la naturaleza proteica de las enzimas.

Las Enzimas son proteínas que tienen la propiedad de aumentar la velocidad de las reacciones químicas interactuando como catalizadores biológicos, son metabolitos que intervienen en el metabolismo celular.

1.2. Estructura de las enzimas

La actividad de la enzima viene dada por su estructura tridimensional (figura 1), la cual está a su vez establecida por la secuencia de aminoácidos que determinan su función.

Figura 1. Estructura enzimática que le permite realizar su función



Durante la catálisis, al ser la enzima de mayor tamaño que el sustrato solo hay una pequeña zona de esta que entra en contacto directo con el sustrato; en esta zona se encuentran dos sitios importantes, uno de ellos reconoce y fija al sustrato (sitio de reconocimiento) y el otro cataliza la reacción (sitio de catálisis), a esta zona de la enzima que queda íntimamente unida con el sustrato se le denomina **centro activo**, por otra parte las enzimas también pueden contener una zona

denominada **sitio alostérico** por donde suele ser regulada su acción catalítica. Sitio con la capacidad de unir un cofactor requerido por algunas enzimas en el proceso de catálisis o de unir pequeñas moléculas como sustratos o productos directamente o indirectamente de la reacción catalizada; estas uniones pueden incrementar o disminuir la actividad enzimática actuando.

Entre los sitios que constituyen el centro activo se pueden distinguir varios componentes que contribuyen por su estructura a la función general que este realiza: El sitio de reconocimiento está formado por el eje peptídico, los grupos de ambientación y grupos de fijación mientras el sitio de catálisis está formado por los grupos catalíticos. (figura 1.2)

Figura 1.2. . Sitios que constituyen el centro activo y que a su vez contribuyen con sus componentes a la función general que este realiza.



Componentes que constituyen a los sitios que forman el centro activo.

1- Eje peptídico: formado por la parte monótona de la estructura polipeptídica, cuyos pliegues y repliegues contribuyen de manera importante a dar la forma tridimensional del centro activo.

2- Grupos de ambientación: Son cadenas laterales de aminoácidos que se encuentran en el centro activo y que son de naturaleza apolar, contribuyendo a que este presente características que no permitan la entrada de agua; esta característica provoca cambios en las propiedades catalíticas de otros grupos y además permite que se refuercen las interacciones débiles entre la enzima y el sustrato.

3- Grupos de fijación: También son cadenas laterales de aminoácidos que presentan grupos funcionales capaces de establecer interacciones específicas con el sustrato; estas interacciones suelen ser de tres tipos fundamentales: puentes de hidrógeno, enlaces salinos o iónicos y fuerzas de Van der Waals.

4- Grupos catalíticos: Son cadenas laterales de aminoácidos que participan en la estructura del centro activo; pero son los que están implicados de forma directa en la transformación del sustrato (catálisis).

1.3. Propiedades de las enzimas

Algunas enzimas, intervienen en la hidrólisis de muchos tipos de proteínas, controlan muchas reacciones diferentes, mientras que otras son muy específicas y sólo pueden acelerar una reacción. Otras liberan energía para la contracción cardíaca y la expansión y contracción de los pulmones. Muchas facilitan la conversión de azúcar y alimentos en distintas sustancias que el organismo precisa para la construcción de tejidos, la reposición de células sanguíneas y la liberación de energía química para mover los músculos; esta variedad de funciones es posible por las siguientes propiedades:

- Acción catalítica: las enzimas aceleran la velocidad de transformación (catálisis) de un sustrato en productos, sin consumirse en la reacción, por eso se le llaman catalizadores por lo que la cinética de las reacciones enzimáticas difiere de las reacciones inorgánicas simples.
- Especificidad: Cada enzima es específica de forma selectiva para la sustancia sobre la que actúa y en la forma que actúa. Para explicar el acoplamiento enzima-sustrato se han supuesto dos hipótesis, basadas en la teoría de Emil Fischer en 1994 sobre la “llave” y su “cerradura” y la teoría de Daniel Koshland en 1958 sobre el modelo del encaje inducido o adaptación inducida; poniéndose de manifiesto la especificidad de sustrato y de acción de la enzima:
 - Especificidad de sustrato: la fuerza no covalente mediante la que los sustratos y otras moléculas se unen a las enzimas son de carácter idénticas a la fuerza que dictan las conformaciones de las propias proteínas, en ambas intervienen interacciones de Van der Waals, electrostáticas, enlaces de hidrógeno e hidrofóbicos. El sitio de unión del sustrato está constituido por una entalladura o grieta sobre la superficie de la molécula de una enzima que es de forma complementaria con la del sustrato (complementariedad geométrica). Además los restos de aminoácidos que forman el sitio de unión se hallan dispuestos para interactuar específicamente con el sustrato de una manera atractiva (complementariedad eléctrica). Las moléculas que se diferencian en la forma o distribución de grupo funcional respecto al sustrato

no puede unirse de modo productivo a la enzima, es decir, no puede formar un complejo enzima-sustrato que conduzca a la formación de un producto.

- Especificidad de acción: Una vez que se ha producido la unión del sustrato al centro activo, solo alguno de los enlaces del sustrato quedará al alcance de los grupos catalíticos de la enzima; de esta forma la enzima podrá realizar una transformación de ese sustrato, aunque este sea susceptible de varias transformaciones. Por ejemplo el ácido glutámico puede experimentar una reacción de α -descarboxilación y producir ácido **GAMMA** – aminobutírico, también una desaminación o transaminación para originar ácido α -cetoglutarico; para cada reacción hace falta una enzima específica, todas con la misma especificidad de sustrato(ácido glutámico) pero con diferente especificidad de acción.
- Eficiencia: Las enzimas como catalizadores, intervienen en las reacciones químicas en cantidades muy pequeñas, pueden participar en la reacción una y otra vez modificando la velocidad de las reacciones reversibles en ambos sentidos, sin alterar el equilibrio final. De ahí que son muy eficaces. Por ejemplo, unos 30 g de pepsina cristalina pura son capaces de digerir casi dos toneladas métricas de clara de huevo en pocas horas.

1.4. Cofactores enzimáticos

La actividad de algunas enzimas depende solamente de su estructura como proteína, mientras que otras necesitan además uno o más componentes no proteicos, llamados cofactores. El cofactor puede ser uno o varios iones inorgánicos tales como Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} o Zn^{2+} o un complejo orgánico o metaloorgánico denominado coenzima.

El complejo enzima-cofactor catalíticamente activo recibe el nombre de holoenzima, cuando se separa el cofactor, la proteína restante, que por si misma es inactiva catalíticamente, se designa con el nombre de apoenzima.

Las enzimas que precisan de iones metálicos se les llama metaloenzimas; el ion metálico puede actuar como centro catalítico primario, como puente para unir el sustrato y la enzima o como agente estabilizador de la conformación de la proteína enzimática en su forma catalítica activa.

Las coenzimas actúan por lo general como transportadores transitorios de grupos funcionales, átomos específicos o de electrones, los cuales son transferidos en la

reacción global. Muchas vitaminas que son nutrientes orgánicos requeridos en pequeñas cantidades en la dieta, son precursores de coenzimas; cuando la coenzima se haya unida íntimamente a la molécula de la enzima recibe el nombre de grupo prostético.

Las coenzimas pueden participar en reacciones de oxidación-reducción como los piridín(NAD⁺ y NADP) y flavin (FMN y FDN) nucleótidos, el ácido lioico, el glutatión y las porfirinas.

En fin la función del cofactor es apoyar a la enzima en la catálisis ya sea como puente Enzima-Sustrato o agente estabilizador en el caso de los iones metálicos o como transportadores transitorios de grupos funcionales, átomos específicos o de electrones, en el caso de las coenzimas.

1.5. Nomenclatura enzimática.

La nomenclatura incluye tanto la especificidad de sustrato como la de acción. Existen dos tipos de nomenclaturas: la **sistemática** y la **recomendada**. La sistemática utiliza los grupos principales, describe la reacción y solo se utiliza en revistas y textos científicos donde se requiera de un elevado grado de precisión, mientras que la recomendada viene a ser una forma abreviada de la sistemática, su uso es común sobre todo en textos para estudiantes; en ambos casos se tiene en cuenta tanto la especificidad de acción como la de sustrato y el nombre de la enzima termina con el sufijo asa. La nomenclatura sistemática de las enzimas, toma como base a los criterios de clasificación de las mismas por lo que estos nombres resultan muy largos y por ello habitualmente se acostumbra a utilizar la llamada nomenclatura recomendada, que consiste en denominar a la enzima por el nombre del sustrato sobre el que actúa seguido de la acción que sobre él ejerce pero cambiándole su terminación por el sufijo asa. Así la ureasa cataliza la hidrólisis de la urea y la ADN polimerasa cataliza la síntesis de ADN. Otro ejemplo se puede observar en la siguiente figura 1.3.

Figura.1.3. Nomenclatura recomendada de la enzima que cataliza la deshidrogenación del ácido láctico para su Interconversión con el ácido pirúvico



Podremos ver que la enzima que cataliza la deshidrogenación del ácido láctico para su interconversión con el ácido pirúvico recibe el nombre de láctico deshidrogenasa o deshidrogenasa láctica.

1.6. Clasificación enzimática

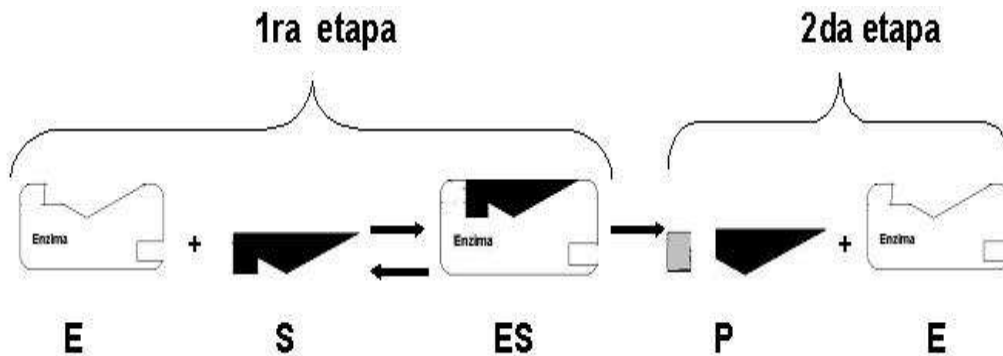
Para la clasificación de las enzimas según su especificidad de acción estas se reúnen en seis grupos principales:

- Oxidorreductasas: Catalizan reacciones de oxidorreducción o redox. Interviniendo en la transferencia de electrones o sus equivalentes, entre un donante y su aceptor; precisando la colaboración de coenzimas. (NAD⁺, NADP⁺, FAD). Un ejemplo de este tipo de enzima lo es la láctico deshidrogenasa que cataliza la deshidrogenación del ácido láctico hasta ácido pirúvico.
- Transferasas: Catalizan la transferencia de grupos químicos entre un donante y un aceptor; transfieren grupos activos (obtenidos de la ruptura de ciertas moléculas) a otras sustancias receptoras. Suelen actuar en procesos de interconversión de monosacáridos, aminoácidos, etc; ejemplo de ellas lo son las transaminasas que catalizan la transferencia del grupo amino y la creatina quinasa que cataliza la transferencia del grupo fosfato.
- Hidrolasas: Catalizan la ruptura de enlaces químicos con la participación de las moléculas de agua; verifican reacciones de hidrólisis con la consiguiente obtención de monómeros a partir de polímeros. Intervienen en la digestión de los alimentos como la amilasa que cataliza el enlace glicosídico $\alpha(1-4)$ de los glúcidos, la lipasa que cataliza el enlace éster del triacilglicérico y la fosfatasa ácida y alcalina que cataliza casi todos los monoésteres ortofosfóricos
- Isomerasas: Actúan sobre determinadas moléculas obteniendo de ellas sus isómeros de función o de posición. Suelen actuar en procesos de interconversión.
- Liasas: Catalizan reacciones en las cuales se produce la adición o sustracción de grupos químicos (H₂O, CO₂ y NH₃) a doble enlaces.
- Ligasas: Catalizan la unión covalente de dos sustratos mediante el acoplamiento a sustancias de alto valor energético como el ATP

1.7. Mecanismo básico de acción de la enzima.

Todas las reacciones enzimáticas se realizan al menos en dos etapas, una primera en la cual se produce el reconocimiento del sustrato y la unión física entre la enzima (**E**) y el sustrato (**S**), que da origen al complejo enzima-sustrato (**ES**), complejo reversible, etapa que se lleva a cabo en el sitio de reconocimiento, y una segunda etapa donde se lleva a cabo la catálisis (modificación del sustrato), dando origen al producto (**P**) y a la enzima libre que está en condiciones de volver a iniciar el proceso, segunda etapa que se lleva a cabo en el sitio de catálisis(figura1.5.)

Figura. 1.5. Representación del mecanismo básico de acción de las enzimas.



Esta unión implica mantener juntas dos moléculas que presentan una estructura complementaria desde el punto de vista espacial o químico o ambos, en un complejo que se estabiliza por un número variable de interacciones débiles.

Los grupos catalíticos son los grupos que intervienen en la segunda etapa de transformación; pero no olvidemos que si la primera etapa no se realiza satisfactoriamente, la segunda etapa se verá también afectada; pues no puede haber una adecuada transformación si la unión ha sido deficiente.

1.8. Cinética enzimática

La función fundamental de la enzima es aumentar la velocidad de la reacción química que ocurre en los seres vivos. El comportamiento de esta velocidad y su modificación debido a la presencia de diferentes factores constituye objeto de estudio de la cinética enzimática.

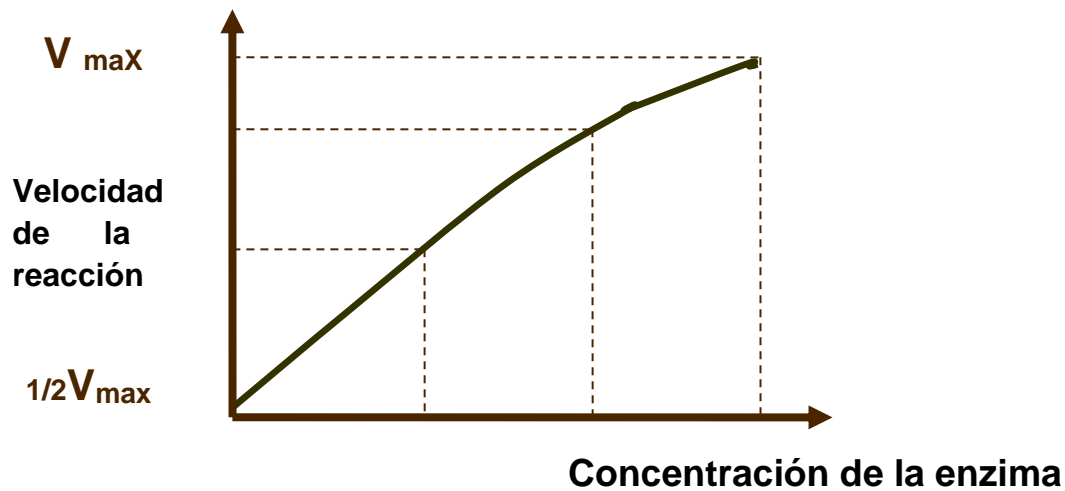
La velocidad de una reacción está determinada por las características estructurales de la enzima y el sustrato; sin embargo existen una serie de factores que pueden modificarla; estos son la concentración de la enzima, del sustrato, de

los cofactor, de los iones H^+ (expresados como unidades de pH), así como la temperatura, la presencia de inhibidores y activadores.

Efectos de la concentración de la enzima.

Si la concentración del sustrato está en exceso, a medida que aumenta la concentración de la enzima se incrementa la formación del complejo enzima-sustrato y por ende la transformación del sustrato (catálisis).(figura 1.6)

Figura 1.6. Representación gráfica del efecto de la concentración de la enzima.



La relación directamente proporcional que existe entre la velocidad de las reacciones enzimáticas y la concentración de enzima permite la determinación de la concentración de algunas enzimas en los líquidos o tejidos corporales; constituyendo este principio la base para la determinación en los laboratorios biomédicos de las concentraciones séricas de amilasa, transaminasas, quininas, peptidasas, láctico deshidrogenasa, creatin quinasa, fosfatasa ácida y alcalina entre otras.

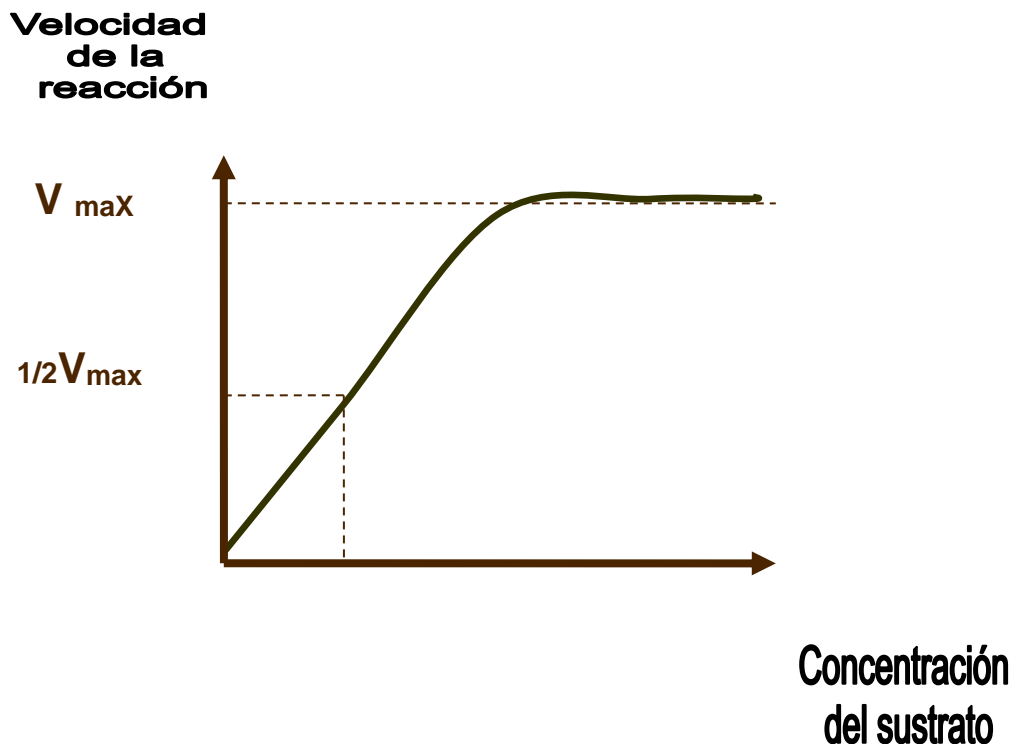
Este factor se debe tener en cuenta a la hora de determinar la actividad de cualquier enzima en el laboratorio biomédico, pues es de suma importancia su conocimiento para que el médico pueda realizar un buen diagnóstico, ya que si se varía la cantidad de suero o reactivo que describe el procedimiento técnico se corre el riesgo de obtener un resultado por encima o por debajo de la cifra real que tiene el paciente.

Efectos de la concentración del sustrato.

Al aumentar la concentración de sustrato en una reacción enzimática se produce un aumento directo y proporcional de su velocidad, hasta un punto, a partir del

cual permanece constante, pues la enzima se satura de sustrato al llega un momento en que determinada concentración de sustrato logra ocupar todos los centros activos de las enzimas, por lo que si se aumenta la concentración del sustrato la velocidad de la reacción no aumentará sino se mantendrá constante (figura 1.7). Ello se debe tener en cuenta en las determinaciones enzimáticas que se realizan en el laboratorio; en estas la concentración del sustrato siempre se mantiene en exceso para que haya suficiente para que con cualquier concentración de enzima que tenga la muestra del paciente, siempre haya sustrato para transformar, factor que debe tener en cuenta el bioanalista clínico pues de añadir una cantidad de sustrato superior a la establecida en el procedimiento técnico se estaría introduciendo un error por dilución de la muestra al variar su volumen total; afectándose por ende el resultado final.

Figura 1.7. Representación gráfica del efecto de la concentración del sustrato.

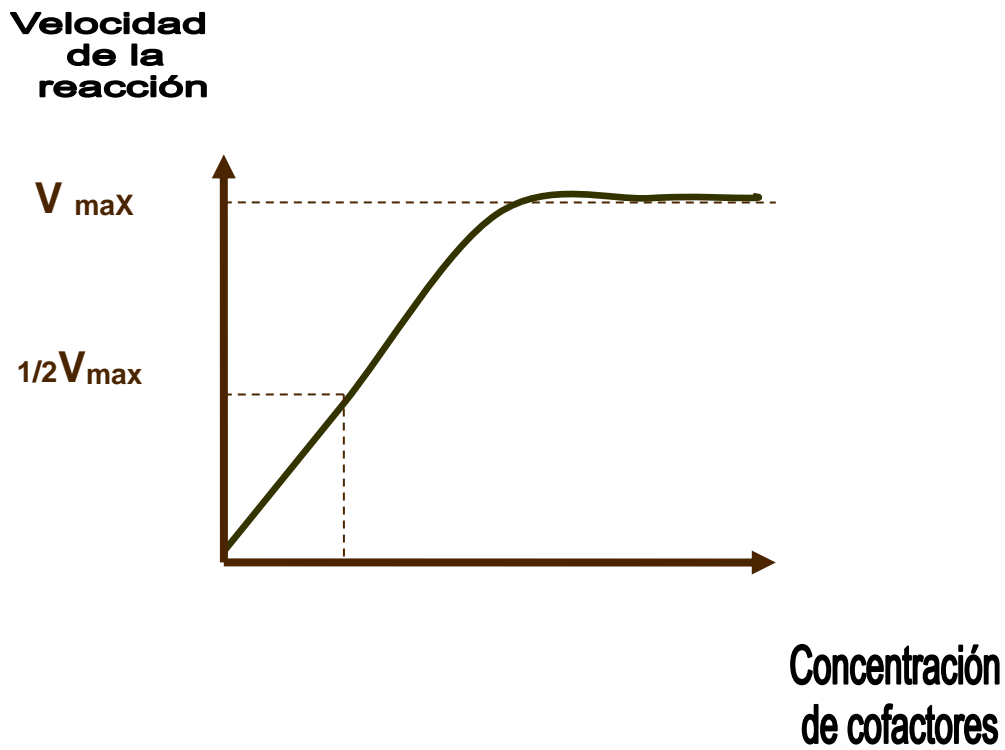


Efectos de la concentración de cofactores.

Existen enzimas que dependen solamente de su estructura proteica para garantizar su actividad catalítica, mientras que atendiendo a su complejidad funcional existe otro grupo numeroso que requiere de un complemento de estructura no proteica, denominado cofactor para poder ejercer su actividad. Este cofactor desempeña una función importante en la formación del complejo enzima-

sustrato, ya que su presencia le confiere a la proteína catalítica el efecto que esta describe normalmente, y de hecho los cofactores participan en la reacción enzimática como si fuesen sustratos; y por tal razón su comportamiento responde a la cinética que caracteriza al sustrato. Por lo que la concentración de cofactores suele tener un efecto similar a la concentración de sustrato, solo teniendo en cuenta que esta vez la enzimas no se satura de sustrato sino de cofator.(figura 1.8)

Figura 1.8. Representación del efecto de la concentración de cofactores.



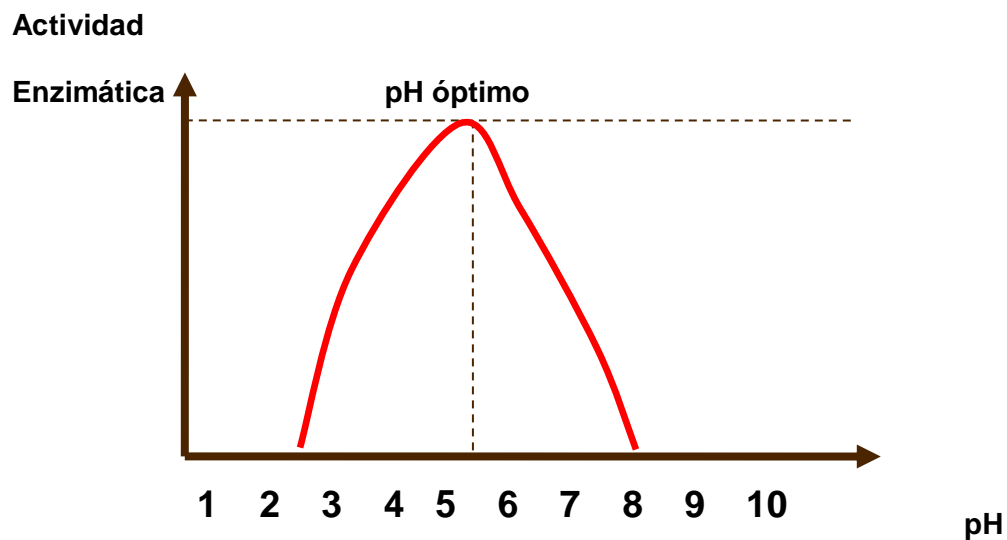
Efecto de la concentración de iones H^+ (pH)

La mayoría de las enzimas presentan las características de presentar el máximo de la actividad catalítica a un pH óptimo, disminuyendo su actividad a valores superiores e inferiores de este (vea figura 1.9) ya que las variaciones del pH puede modificar el estado de disociación de los grupos químicos presentes en la enzima o en el complejo enzima-sustrato; afectándose la unión enzima-sustrato o la transformación del sustrato en producto respectivamente. A valores extremos de pH (cerca de 0 ó 14) puede producirse la desnaturalización de la enzima, consecuencia ello de la naturaleza proteica de la enzima.

Las proteínas presentan diferentes estados de ionización de acuerdo con el pH del medio. En el pH óptimo el estado de ionización de la enzima es el que permite que se produzca una mejor unión de la enzima con el sustrato, un estado de ionización

de los grupos catalíticos del centro activo que hace más eficiente la catálisis o ambos. A partir de ello cada enzima tiene su pH óptimo por lo que en las determinaciones enzimáticas los sustratos vienen disueltos en una solución buffer, que posibilita mantener el pH, por ello se debe tener cuidado de no contaminar el reactivo, conservarlo en refrigeración y velar la fecha de vencimiento del mismo, pues preservando el reactivo estamos garantizando que el pH no varíe y por lo tanto que no se afecte la velocidad de la actividad enzimática.

Figura 1.9. Representación de la actividad enzimática en función del pH

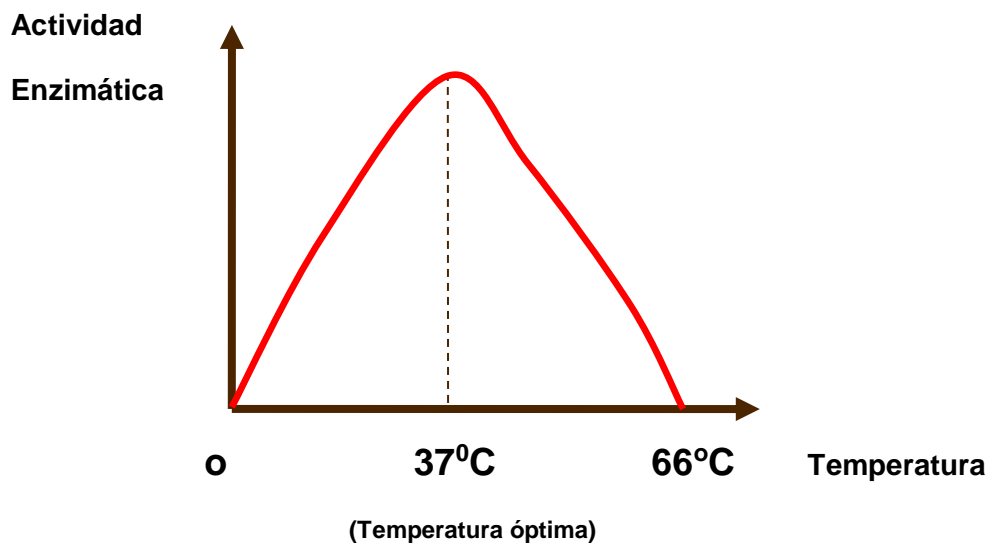


Efecto de la temperatura.

En toda reacción química, el aumento de la temperatura produce un aumento de la velocidad de la reacción enzimática, pues el aumento de la temperatura produce una elevación de la energía cinética de las moléculas del sistema con lo que se logra que haya mayor número de colisiones moleculares energéticamente suficientes para desencadenar la reacción. Sin embargo al analizar el efecto que provoca la temperatura sobre las reacciones enzimática debemos tener en cuenta la naturaleza proteica de la enzima, que las hace susceptibles a los cambios de temperatura (termolabilidad); provocando tanto el aumento como la disminución de la temperatura, la ruptura de interacciones débiles que mantienen la estructura; produciéndose una alteración de la estructura tridimensional; afectándose su conformación nativa y en especial su centro activo; reduciéndose al mínimo su actividad catalítica; existiendo por ello un rango de temperatura para el cual se hace máxima la acción catalítica de la enzima, al cual se le denomina valor temperatura óptima.(figura 1.10), Debido a ello este es un factor a tener presente

en las determinaciones enzimáticas que se realizan en el laboratorio, en las cuales generalmente las muestras se incuban al baño de maría a 37°C, lo cual debe comprobarse con exactitud pues a valores superiores e inferiores de la temperatura óptima, decrece la actividad catalítica, ya que se manifiestan dos fenómenos respectivamente opuestos en las enzimas: la **inactivación térmica** (desnaturalización por el calor) que disminuye considerablemente la velocidad de la reacción hasta hacerla cero y la **disminución de la movilidad molecular**, evitando este último que se produzcan las colisiones energéticamente suficientes para que se desencadene la reacción y ocurra la transformación del sustrato en producto.

Figura 1.10 Representación de la actividad enzimática en función de la temperatura



Por lo general, las enzimas ejercen su acción de forma óptima a temperaturas inferiores a 40 °C; la congelación no destruye habitualmente las enzimas.

Presencia de los activadores

Como activadores se definen las pequeñas moléculas generalmente iones inorgánicos que son requeridos o al menos estimulan, la actividad catalítica de una enzima y al contrario de los cofactores no son participantes explícitos de la reacción. La mayoría de los iones metálicos actúan como activadores de la actividad enzimática; estos incluyen los microelementos y algunos macroelementos. Así, el Cu, Fe, Mg, Ca, Zn, Mo, K, Na y otros, realizan esta

función. El mecanismo del efecto de los activadores puede ser diferente: unos activan a la enzima, en cambio otros al sustrato

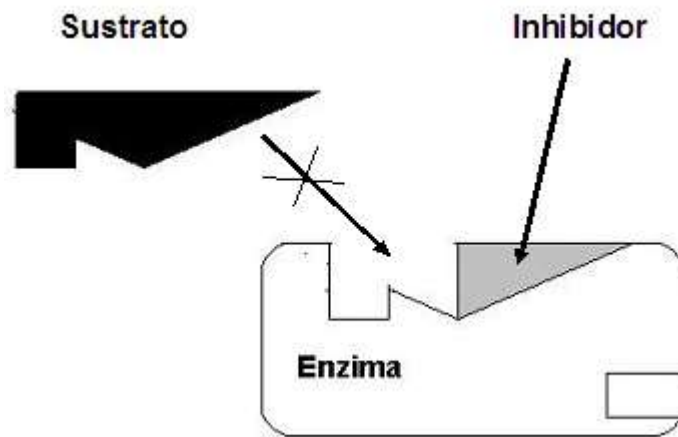
El efecto de la variación de concentración de los activadores es muy similar al de la coenzima; la velocidad de reacción aumenta rápidamente al principio con el incremento de la concentración hasta un punto máximo a partir del cual la velocidad puede permanecer constante aunque generalmente decrece indicando de nuevo un efecto inhibitorio. Los agentes que activan por extracción de metales inhibidores pueden inhibirse a si mismos a altas concentraciones por extracción de metales activadores y en otros caso la inhibición podría ser atribuida a cambios iónicos. En el caso de la amilasa que es activada por los aniones cloruro, bromuro y yoduro en orden decreciente, se encuentra un cambio en la curva de actividad del pH, con un pH óptimo desplazado hacia el lado alcalino.

Presencia de los inhibidores.

Inhibidores son todas aquellas sustancias capaces de mostrar una interacción con la enzima, provocando a su vez la disminución de su actividad catalítica, incluso al extremo de que la velocidad de reacción de la enzima se anule totalmente. La inhibición enzimática puede ser **reversible** o **irreversible**.

- La **inhibición reversible** es en la que el inhibidor forma con la enzima un complejo enzima-inhibidor (EI) unido por fuerzas no covalentes. La inhibición reversible puede clasificarse a su vez en **competitiva y no competitiva**.
 - La **competitiva** es en la cual al presentarse una similitud entre el inhibidor y el sustrato natural de la enzima, ambos compiten por unirse al centro activo de la enzima, no formándose el producto de ganar el inhibidor esta competencia pues la enzima estará bloqueada (figura 1.11), para normalizar ello solo bastará con aumentar la concentración del sustrato.

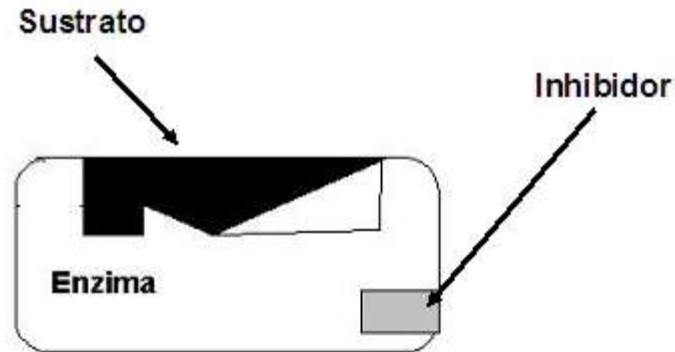
Figura 1.11. En la inhibición competitiva se establece una competencia entre el inhibidor y el sustrato por ocupar el centro activo.



Los inhibidores competitivos presentan un gran uso en la práctica médica, por cuanto bloquean la acción enzimática en microorganismos, ya sean bacterias o parásitos, no permitiendo el desarrollo y reproducción de los mismos; un ejemplo de ello es la inhibición del ácido (P) aminobenzoico (PABA) por las sulfonamidas, Las bacterias requieren PABA para formar ácido fólico(vitamina hidrosoluble); la sustitución por las sulfamidas es fatal para ellas. En la práctica los inhibidores competitivos son potentes quimioterápicos.

- En el caso de la **no competitiva**, el inhibidor tiene gran afinidad por la enzima y se combina con esta por otro lugar que no es precisamente el centro activo, pero se provoca una deformación en la conformación espacial de la enzima que trae como resultado una alteración de la actividad enzimática quedando la enzima inactiva, pues aunque el sustrato logre unirse a la enzima no se realizará la catálisis(figura 1.12); en este caso no depende de las concentraciones relativas de sustrato ni del inhibidor.

Figura 1.12. En la inhibición no competitiva el inhibidor se une a la enzima por el sitio alostérico provocando una deformación de la conformación espacial de la enzima, que evita la unión satisfactoria entre la enzima y el sustrato por lo tanto no se lleva a cabo la catálisis.



Como hemos visto anteriormente los inhibidores de las enzimas se dividen en dos clases competitivos y no competitivos, puesto que la inhibición competitiva es minimizada o abolida por el aumento de la concentración del sustrato, en el caso de un inhibidor competitivo queda alterada la forma de la curva de actividad/concentración de sustrato requiriéndose más elevada concentración de sustrato para alcanzar la velocidad máxima, esto significa que en presencia de un inhibidor competitivo resulta aumentada la K_m (constante de Michaelis-Menten). Aumentando la concentración de sustrato no se produce efecto sobre la inhibición de tipo no competitiva por lo que en este caso permanece inalterada la K_m . Por lo tanto determinando la K_m en presencia y en ausencia del inhibidor es posible determinar si su modo de actuar es competitivo o no.

- La **inhibición irreversible** es en la que se establece entre la enzima y el inhibidor una relación muy estable que impide la recuperación de la actividad enzimática, lo cual no tiene nada que ver con el proceso de desnaturalización y la enzima no se afecta estructuralmente. En éstas es característico la unión covalentemente a la enzima y son útiles en farmacología (penicilina, aspirina).

La acción de inhibidores afecta a determinadas enzimas entre los que podemos encontrar a los detergentes y las sales de metales pesados de ahí la importancia de prestar extrema atención a la limpieza de la cristalería que se utiliza en la determinación de la actividad enzimática en los laboratorios, prestando gran atención a su enjuague y conservación de manera que quede libre de detergentes y metales pesados.

La regulación de la velocidad de la reacción química por inhibidores y activadores se pone de manifiesto en el metabolismo de productos farmacológicos; pues en lugar de los receptores, algunos fármacos utilizan como diana las enzimas que son las encargadas de regular la velocidad de las reacciones químicas. Un ejemplo lo es la **lovastatina**, un fármaco que reduce el nivel de **colesterol** endógeno, inhibe la **HMG-CoA reductasa** que es una enzima fundamental en la producción del colesterol por el organismo. Mientras que, un efecto adverso es producido por el **antibiótico rifampicina**, viene determinado por la activación de las enzimas implicadas en el metabolismo de los anticonceptivos orales, pues cuando una mujer que está tomando **anticonceptivos orales**, toma rifampicina de forma simultánea, el anticonceptivo es metabolizado y eliminado del cuerpo con más rapidez de lo habitual, y por lo tanto, su efecto puede ser ineficaz.

Efecto de las enzimas reguladoras.

Las **enzimas reguladoras** son enzimas que regulan el metabolismo celular mediante formas especializadas de efectos regulatorios. Este tipo de efecto determina el comportamiento general de los procesos metabólicos que conforman la actividad que se lleva a cabo continuamente en las células y tejidos y está representado por cuatro mecanismos: alostérico, modulación covalente, zimógeno e isozimas.

Enzimas reguladoras por efecto alostérico.

Las **enzimas reguladoras por efecto alostérico** también conocidas como **enzimas alostéricas** son aquellas cuya actividad catalítica está modulada por la unión no covalente de un metabolito específico al sitio alostérico, denominado efector alostérico, metabolito que provoca un cambio conformacional en la molécula enzimática, que puede producir un aumento o disminución de la actividad catalítica según sea el efecto, positivo (activadores) o negativo (inhibidores). Estos efectores alostéricos no tienen efecto catalítico, sino regulador de la actividad enzimática, convirtiéndose en el mecanismo de control más rápido que posee la célula.

Las enzimas alostéricas se encuentran situadas al inicio de una secuencia metabólica determinada y su actividad está regulada por la concentración del sustrato inicial de la reacción, el cual se convierte en el modulador positivo ya que la concentración del sustrato favorece el incremento de la velocidad de la vía metabólica; por otra parte la actividad de la enzima puede estar regulada por la concentración del producto final de la secuencia metabólica, convirtiéndose este en el modulador negativo. Un ejemplo de ello lo tenemos en el comportamiento de

la fosfofructoquinasa la cual varía su velocidad al variar la concentración de sustrato en sangre. La presencia de ATP disminuye la velocidad catalítica por lo tanto actúa como un efector negativo (inhibidor), mientras que la concentración de ADP aumenta la velocidad catalítica por lo tanto actúa como un efector positivo (activador). Este tipo de regulación se denomina retro-inhibición. La acumulación del producto final de la ruta hace que toda la ruta funcione más lentamente. Un ejemplo de tal retro-inhibición es el sistema enzimático bacteriano que cataliza la conversión de L- treonina en L- isoleucina. La primera enzima de este sistema la treonina deshidratasa es inhibida por la isoleucina que es el producto de la última reacción. La isoleucina es muy específica como inhibidora; ningún otro intermediario de esta secuencia de reacciones inhibe la treonina deshidratasa ni ninguna otra enzima es inhibida por la isoleucina, la unión de la isoleucina es de tipo no covalente por lo que es reversible; si disminuye la concentración de isoleucina aumenta la actividad de la treonina deshidratasa. De este modo la actividad de la treonina deshidratasa responde rápida y reversiblemente a las fluctuaciones de isoleucina en la célula.

Los moduladores de las enzimas alostéricas pueden ser inhibidores o activadores. El propio sustrato es a menudo un activador y las enzimas en las que el sustrato y modulador son idénticos se denominan homotrópicas. Cuando el modulador es una molécula diferente de la del sustrato la enzima es heterotrópica.

Enzimas reguladoras por modulación covalente.

Las **enzimas reguladoras por modulación covalente** son aquellas cuya actividad catalítica está condicionada por la acción de otras enzimas que permiten la unión covalente o separación de un resto de ácido fosfórico o de adenilo en otros casos, procedentes del ATP, lográndose así la interconversión reversible de las formas activas e inactivas de las enzimas reguladoras; el ejemplo típico del primer caso (unión covalente de un resto de ácido fosfórico) un ejemplo de ello es la **glucógeno fosforilasa** que es activada por la incorporación de residuos de ácido fosfórico, originando así la fosforilasa a (forma activa) y esta a su vez puede pasar a la forma desfosforilada que es la fosforilasa b (forma menos activa); la glucógeno fosforilasa es la enzima que regula la degradación del glucógeno en los tejidos animales (hígado y músculo); como ejemplo del segundo tipo (unión covalente a un resto de adenilo) está la **glutámico-sintetasa** que pasa de la forma activa a la inactiva mediante la unión o separación de residuos de adenilo a su estructura.

Enzimas reguladoras por el efecto zimógeno.

Los **zimógeno** son precursores inactivos de algunas enzimas que son activados mediante mecanismos relativamente específicos, en el momento adecuado, siendo sintetizados en una forma que no poseen actividad catalítica garantizando que no actúen hasta que las condiciones del medio sean las propicias; como ejemplo de estas proenzimas está en el jugo gástrico el pepsinógeno, en el jugo pancreático el tripsinógeno, quimotripsinógeno, proelastasa y procarboxipeptidasa, las cuales son activadas mediante un fenómeno de proteólisis parcial de la cadena polipeptídica que libera un fragmento peptídico que mantiene bloqueado el centro activo en el zimógeno.

Dado que este tipo de activación es irreversible se necesitan otros mecanismos para inactivar estas enzimas. Las enzimas proteolíticas son inactivadas por proteínas inhibidoras que se fijan muy fuertemente al centro activo de la enzima. El inhibidor de tripsina pancreática se fija a la tripsina inhibiéndola; la alfa 1-antiproteinasa inhibe principalmente la elastasa. La insuficiencia de alfa 1 antiproteinasa que se cree debida a la exposición al humo del tabaco produce lesión pulmonar y una enfermedad conocida como enfisema.

Otros ejemplos de activación de zimógeno se dan en las hormonas, tejido conjuntivo y sistema de coagulación de la sangre. La hormona insulina se produce por rotura de la pro-insulina, el colágeno se sintetiza originalmente en forma de un precursor soluble denominado pro-colágeno y la coagulación de la sangre transcurre a través de una compleja cascada de activaciones de zimógenos

Enzimas reguladoras por la diferencia en sus formas moleculares (isoenzimas o isozimas).

Las isoenzimas o isozimas son enzimas que difieren en la secuencia de aminoácidos, pero que catalizan la misma reacción química suelen mostrar diferentes parámetros cinéticos o propiedades de regulación diferentes. En particular, las sustituciones de aminoácidos que cambian la carga eléctrica de la enzima (por ejemplo, la sustitución de ácido aspártico con ácido glutámico) son fáciles de identificar por electroforesis en gel, constituyendo esto la base para el uso de las isoenzimas como marcadores moleculares.

Las isoenzimas constituyen un grupo de enzimas específicas que presentan más de una forma molecular, a pesar de poseer la misma función catalítica; su característica es que poseen varias subunidades estructurales en las cuales la composición y secuencia aminoacídica puede ser diferente en cada una de estas, por lo que los valores de sus puntos isoeléctricos difieren y en ello se basan los métodos de detección y separación de estas mediante la electroforesis en geles.

Las isoenzimas: son diferentes formas moleculares de una misma enzima que pueden encontrarse en distintos tejidos y cuyo estudio puede tener importancia clínica. Cada isoenzima tiene actividad diferente con cada sustrato, como por ejemplo: La creatinfosfoquinasa es una enzima que está formada por dos moléculas: una M y otra B. Estas moléculas se pueden combinar de varias maneras formándose entonces tres isoenzimas que son las: CPK – MB ; CPK – BB ; CPK – MM. Otro ejemplo de isoenzima es la glucoquinasa, una variante de hexoquinasa que no es inhibida por la glucosa-6-fosfato. Sus diferentes funciones de regulación y su menor afinidad por la glucosa (en comparación con otras hexoquinasas), le permiten tener diferentes funciones en las células de determinados órganos, como el control de la liberación de insulina por las células beta del páncreas, o la iniciación de la síntesis de glucógeno por las células del hígado.

1.9. Ejercicios de Comprobación del Capítulo 1

1. Seleccione verdadero (V) o Falso (F) según corresponda y subraye la palabra que determine su selección falsa.

- a) ___ Las enzimas se caracterizan por presentar bajo poder catalítico.
- b) ___ Los grupos de fijación catalizan la transformación del sustrato en producto.
- c) ___ Los grupos de ambientación se relacionan directamente con la etapa de catálisis.
- d) ___ Un inhibidor competitivo puede ser desplazado del centro activo de la enzima a elevadas concentraciones de sustrato.
- e) ___ Las enzimas alostéricas existen en dos estados conformacionales.
- f) ___ Las enzimas reguladas por modulación covalente requiere de la acción de otra enzima que cataliza su unión o separación del resto de ácido fosfórico

2. Seleccione verdadero (V) o Falso (F) según corresponda. Justifique los falsos.

- a) ___ Los grupos de fijación establecen con el sustrato interacciones covalentes.
- b) ___ En la etapa de reconocimiento se forma el complejo ES.
- c) ___ Los grupos fijadores son cadenas laterales de polipéptidos.
- d) ___ Un inhibidor no competitivo se introduce en el sitio alostérico de la enzima.
- e) ___ Los mecanismos de modulación covalente está asociados con el sustrato o el producto de la reacción.

f) ____ Las enzimas pueden catalizar cualquier tipo la reacción.

3. Complete los espacios en blanco teniendo en cuenta las características de los biocatalizadores y de los procesos metabólicos.

- a) Al ARN con actividad catalítica se le conoce como _____
- b) Las enzimas cuya función esta relacionada con catalizan la ruptura de enlaces químicos _____
- c) La concentración de la enzima en la reacción es directamente proporcionas a su _____
- d) Los biocatalizadores tienen la propiedad de aumentar la velocidad de la _____
- e) A la parte donde la enzima se une al sustrato se le llama _____
- f) El estudio de las isoenzimas tiene gran importancia clínica pues estas son _____

4. El uso de los biocatalizadores en el laboratorio tiene gran importancia por las características de los mismos.

a) Argumente la afirmación anterior

5. Complete los espacios en blanco teniendo en cuenta las características de los biocatalizadores y de los procesos metabólicos.

- a) Las enzimas que transfieren grupos químicos se clasifican como _____
- b) En las reacciones químicas al intervenir un biocatalizador se disminuye su _____
- c) La catálisis se lleva a cabo en el _____
- d) Las enzimas juegan un importante papel en las pruebas que se llevan a cabo en el laboratorio por su _____
- e) La enzima es un biocatalizador de naturaleza _____

6. Las enzimas son biocatalizadores cuyas propiedades han acelerado su uso en los laboratorio biomédicos

- a) Mencione las propiedades de la enzima y explique una de ellas
- b) Algunos biocatalizadores para realizar su función requieren de cofactores. ¿Cómo se les llama a las enzimas una vez que están unidas a su cofactor, según el sustrato al que esta se una?
- c) ¿Qué importancia le atribuyes al conocimiento de los factores que puedan afectar la estructura, propiedad y función de los biocatalizadores, para su buen desempeño profesional?

7. Complete los espacios en blanco teniendo en cuenta las características de los biocatalizadores y de los procesos metabólicos.

- a) En las reacciones químicas donde intervienen enzimas al aumentar la velocidad esta pone de manifiesto su propiedad _____
- b) Los anticuerpos con actividad catalítica son _____
- c) A las enzimas que intervienen en la ínter conversión de isómeros se les nombra _____
- d) La complementariedad geométrica se pone de manifiesto en _____
- e) El eje peptídico, los grupos de ambientación y los grupos de fijación garantizan la unión _____
- f) A los precursores inactivos de algunas enzimas que son activados mediante un fenómeno de proteólisis parcial se les nombra _____

8. Selecciones verdadero (V) o Falso (F) según corresponda: y convierta los Falsos en Verdaderos.

- a) ___ Las enzimas se caracterizan por presentar un elevado poder catalítico
- b) ___ El eje peptídico no permite la entrada de agua (H_2O) al centro activo
- c) ___ Los grupos de fijación catalizan la transformación del sustrato en producto
- d) ___ Los grupos de ambientación se relacionan directamente con la etapa de unión.
- e) ___ Los grupos de fijación establecen con el sustrato interacciones no covalentes
- f) ___ La complementariedad eléctrica se establece entre los grupos del centro activo y el sustrato
- g) ___ En la etapa de transformación se forma el complejo ES
- h) ___ Los grupos fijadores son cadenas laterales de aminoácidos apolares
- i) ___ El eje peptídico está relacionado con la complementariedad geométrica o espacial.
- j) ___ Los grupos catalíticos están relacionados con la etapa de unión

9. Seleccione verdadero (V) o falso (F) según corresponda y subraye la palabra que determine su selección falsa.

- a) ___ El pH óptimo de las enzimas es 7,4, por ser el pH fisiológico.
- b) ___ La velocidad máxima (V_{max}) es la velocidad de reacción cuando toda la enzima presente está formando el complejo ES.
- c) ___ Un inhibidor competitivo puede ser desplazado del centro activo de la enzima al elevarse la concentración del sustrato.
- d) ___ En una inhibición no competitiva el valor de K_m se mantiene y el de V_{max} disminuye.
- e) ___ La velocidad máxima (V_{max}) se relaciona con la especificidad de sustrato de la enzima.
- f) ___ Cuando se aumenta la concentración de H^+ , la velocidad de la reacción enzimática se incrementa directa y proporcionalmente

10. Seleccione verdadero (V) o falso (F) según corresponda. Y justifique los falsos

- a) ___ Los efectores se unen a la enzima por su centro activo.
- b) ___ Generalmente los mecanismos de modulación covalente está asociados al fenómeno de amplificación.
- c) ___ Las enzimas de modulación covalente tienen una forma en la que poseen un grupo fosfato unido por enlace covalente
- d) ___ Los activadores son participantes explícitos de la reacción enzimática
- e) ___ En una vía metabólica generalmente la primera enzima es alostérica y uno de sus efectores negativos o inhibidor es el producto final de la vía
- f) ___ El aumento de la temperatura en una reacción es directamente proporcional a su velocidad.
- g) ___ Las isoenzimas son enzimas con más de una forma molecular que presentan los mismo valores de puntos isoeléctricos.
- h) ___ Las enzimas alostéricas presentan otros sitios diferentes del centro activo por donde se une el efector.
- i) ___ El ADP es un inhibidor alostérico de la enzima isocítrico deshidrogenasa constituyendo el ATP producto de su acción.
- j) ___ La activación de los zimógenos es reversible
- k) ___ La forma activa de las enzimas reguladas por modulación covalente es la desfosforilada.
- l) ___ En la inhibición irreversible se establece entre la enzima y el inhibidor una relación que impide la recuperación de la actividad enzimática

CAPÍTULO 2. USO DE LAS ENZIMAS EN EL LABORATORIO BIOMÉDICO.

Muchas enzimas son utilizadas en los laboratorios biomédicos con fines diagnósticos; clasificándose estas atendiendo a sus características según su uso en: enzimas como medio de diagnóstico o índice de enfermedad y enzimas como herramientas de trabajo o reactivos químicos.

2.1. Las enzimas como medio de diagnóstico o índice de enfermedad.

Estas son enzimas internas que se utilizan como marcadores de lesión celular, utilizadas para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de enfermedades.

2.1.1 Las enzimas como medio de diagnóstico o índice de enfermedad en el Laboratorio Clínico.

El interés de los clínicos por las enzimas séricas comenzó hace más de medio siglo, con la demostración de la utilidad de la determinación de los niveles de fosfatasa alcalina en el diagnóstico de las enfermedades óseas y hepatobiliares; de los niveles de fosfatasa ácida en el diagnóstico del carcinoma de la próstata, y de los de amilasa y lipasa en el diagnóstico de las pancreatitis.

Pese a ello el interés clínico de la enzimología sérica no aumentó hasta el año 1953 en el cual se demostró la presencia de una transaminasa (la TGO) en el suero de individuos normales observándose que el aumento de sus niveles eran útiles para el diagnóstico de enfermedades cardíacas y hepáticas. Actualmente son más de 50 las enzimas identificadas en suero, estudiándose sus niveles y aplicándose pruebas para algunos problemas clínicos que se consideran como procedimientos habituales en el laboratorio.

Todas las enzimas séricas tienen su origen en las células, muchas proceden de numerosos tejidos, entre ellas la aldosa, la láctico deshidrogenasa, la fosfohexoisomerasa, la málico deshidrogenasa entre otras. Por otra parte, también se pueden encontrar enzimas con distribución hística como la ornitil carbamil transferasa y alcohol deshidrogenasa que se halla casi exclusivamente en el hígado.

En muchas enfermedades orgánicas las enzimas aumentan su salida de su lugar de origen por el incremento de la permeabilidad de las membranas celulares o por la pérdida de la estructura celular; originándose así las modificaciones del nivel enzimático en el plasma sanguíneo, de indudable valor diagnóstico.

A continuación se describen algunos procedimientos en los cuales se contemplan detalles y particularidades de cada examen de química clínica en lo que se refiere

a generalidades, indicaciones, modalidad de solicitud, preparación del paciente, modalidad de la toma de muestra, transporte, conservación, verificación de la muestra, metódicas de determinación con relativas interferencias, valores de referencia, criterio de validación y el modo de escribir los resultados; pues muy pocas enzimas son específicas de un solo tejidos, por esa razón en ciertas ocasiones se debe determinar como alternativas más de una enzima (por ejemplo “perfil hepático”).

➤ **Enzima Amilasa**

Generalidades

La amilasa es una hidrolasa que cataliza la división de los enlaces glicósido $\alpha(1-4)$ de los polisacáridos vegetales (hidrolisis del almidón a destrina) y animales (hidrolisis del glucógeno a glucosa)

La amilasa se produce en el páncreas (isoamilasa P) , las glándulas salivales, y en pequeña concentración, en el hígado y las trompas de Falopio (isoamilasa S) esta es eliminada rápidamente por el riñón debido a que es una molécula pequeña. Los valores de referencia de la amilasa en suero: $< 89 \text{ U/L}$ ($< 1,48 \mu\text{kat/L}$) y en orina $< 220 \text{ U/L}$.

Procedimiento del método cinético

Mezclar 2mL de reactivo amilasa con 30 μL de la muestra e incubar a 37 °C durante 1 min. Leer la variación de absorbancia de la muestra ($\Delta\text{DO}/\text{min}$) durante 3 min contra agua purificada a 405 nm a 37 °C. Calcular la actividad de la α amilasa

Cálculo de la atividade de la amilasa

$$\text{U/L} = \Delta\text{DO}/\text{min} \times 4640$$

Donde

U/L= Atividade de la α amilasa en la muestra

$\Delta\text{DO}/\text{min}$ = Variación de absorbancia de la muestra por minuto..

4640 = Factor de actividad enzimática

Para las muestras de orina se multiplicará el resultado por 2.

(Se debe comprobar el factor, con los controles, cada vez que se realice por primera vez el procedimiento).

Fundamento o principio del método

La amilasa presente en la muestra se encarga de la hidrólisis directa del sustrato CNP-G3 (2-cloro-4- nitrofenil- α -maltotriosido) para producir CNP (2-cloro-4-nitrofenol) que al liberarse produce un color amarillo cuya concentración, medida espectrofotométricamente a 405 nm a partir del incremento ocurrido en la absorbancia, es proporcionar a la actividad de la α -amilasa presente en la

muestra, por lo que es un método cinético colorimétrico cuya reacción se muestra a continuación:



CNP- G3 = (2-cloro-4-nitrofenil- α -maltotriosido)

CNP = 2-cloro-4-nitrofenol

CNP - G 2 = 2-cloro-4-nitrofenol- α -maltosa

Otros métodos para la determinación de la amilasa

- Método del amilo clásico

La medida de la actividad de la enzima se efectúa con métodos basadas sobre la disminución o desaparición de la concentración del sustrato con medida turbidimétrica; viscosimétrica; colorimétrica yodo, almidón.

- Método sacarogénico

La medida de la actividad de la enzima se efectúa con metódica basada sobre la producción de azúcar reductora.

Patologías asociadas

La determinación de la amilasa es de importancia fundamental en el diagnóstico de las enfermedades pancreáticas como la pancreatitis aguda, crónica y en neoplasia del páncreas; en estos casos la amilasa suele aumentar entre la 5-6 horas después de la sintomatología clínica alcanzando valores de 10-30 veces mayor de los normales; descendiendo entre las 24 y 30 horas a valores séricos normales, aumentando sus niveles en orina entre las 24 y 48 horas después por el aumento de su excreción urinaria, persistiendo la hiperamilasuria 3 o 5 días, luego de que la actividad sérica de la amilasa ha alcanzado los niveles normales; debido a que la amilasa es una molécula pequeña que puede ser depurada rápidamente por los riñones.

El incremento sérico de la amilasa también está relacionado con enfermedades como la parotiditis, úlcera péptica perforada, apendicitis, rotura de un ectópico, aneurisma diseminado de la aorta, insuficiencia renal, colecistitis aguda, exacerbación aguda de la pancreatitis crónica, obstrucción del conducto pancreático, alcoholismo (intoxicación), obstrucción intestinal; mientras que su disminución está relacionada con hepatitis, cirrosis hepática, toxemia del embarazo y quemadura severa.

Materiales

Guantes descartables no estériles, tubos de ensayo 16 x 100 mm, puntas de pipeta 10-50 ul, puntas de pipeta 50-200 ul, puntas de pipeta 200-1000 ul, puntas de pipeta 1000-5000 ul.

Equipos

Centrífuga, espectrofotómetro, baño maría, reloj marcador, pipetas automáticas 10-50 ul, pipetas automáticas 50-200 ul, Pipetas automáticas 200-1000 ul, Pipetas automáticas 1000-5000 ul.

Control de calidad

Se deberán usar sueros, control normal y patológico, en las mismas condiciones que las muestras.

Verificar el resultado

- Si el valor de la amilasa es $\geq 1000-2000$ U/l, repetir la medida.
- Si el valor del resultado repetido es el mismo, se puede entregar.
- Si el valor del resultado repetido es diferente, procesar nuevamente la muestra utilizando un control patológico.
- Con valores de amilasa \geq de 1500 U/l, repetir la medida, sea concentrada y diluida $\frac{1}{2}$ con solución fisiológica con un control patológico.
- Si está dentro los rangos establecidos, se puede entregar el resultado.
- Si el suero diluido no está en relación con el suero concentrado, diluir la muestra 1/4, 1/8, 1/16 con solución fisiológica, siempre usando el control patológico.

Notas sobre la metódica

Linealidad: La metódica es lineal hasta 1500 U/l.

Sensibilidad → 7.0 U/l.

Especificidad → La metódica es específica para la amilasa total y para todas las isoamilasas (P, S).

Interferencias → Hemólisis: Con Hb ≥ 2.0 g/l; Ictérico: bilirrubina ≥ 20.0 mg/dl.

El citrato y el fluoruro inhiben la reacción. El ácido ascórbico ≥ 30 mg/dl.

Valor de referencia: en orina menor a 220 U/L

Suero: < 89 U/L ($< 1,48$ μ kat/L)

Criterio de validación

Confrontar con lipasa, calcio, funcionalidad del hígado. Controlar parámetros de procesos inflamatorios. Controlar glucosa y metabolismo glucídico. Y los resultados se escriben sin cifras decimales.

Comunicación de riesgo

Se tiene que comunicar inmediatamente, con valores >800.0 U/l

➤ Enzima Transaminasa (TGO-AST)

Generalidades

La transaminasa glutámica oxalacética (TGO) o aspartato aminotransferasa (AST) pertenece al grupo de las transaminasas, las cuales catalizan la transferencia del grupo amino (NH₂) de un aminoácido a su respectivos α ceto-ácido. La AST tienen su localización celular en mitocondrias y citoplasma por ello es una enzima bilocular; esta se encuentra en cantidad elevada en muchos tejidos como el cardiaco y el hepático hígado y corazón, también se le puede hallar en el músculo, riñón, cerebro, páncreas, eritrocitos, leucocitos, pulmón y bazo pero sin gran significación clínica. Cualquier alteración de estos tejidos produce un aumento en los niveles de AST circulante cuyos valores de referencia oxidan entre los 46 U/L.

Procedimiento del método

Mezclar 2 mL de reactivo con 200µL de muestra e incubar a 37 °C durante 1 min. Medir la variación de densidad óptica por minuto (ΔDO/min) durante 3 min contra el blanco a 340 nm

Cálculo de la actividad de AST:

Actividad (U/L) = ΔDO/min x 1746

Donde:

Actividad (U/L): actividad de AST de la muestra.

ΔDO/min: variación de densidad óptica obtenida en los 3 min

1746: factor de actividad enzimática

Fundamento

La AST cataliza la transferencia de un grupo amino entre el L-aspartato y el 2-oxoglutarato que a su vez reacciona con el NADH en presencia de la malato deshidrogenasa (MDH) para formar NAD⁺. La actividad de AST se determina al medir la oxidación de NADH a 340 nm (ó 334) lo cual se cuantifica espectrofotométricamente, según las reacciones que se describen a continuación:

AST



. El reactivo empleado para la determinación, también contiene lactato deshidrogenasa que se encarga de convertir el piruvato endógeno de la muestra en lactato durante la fase inicial previa a la determinación

AST = Aspartato-aminotransferasa
 NADH = Dihidronicotinamida-adenina-dinucleótido
 MDH = Malato deshidrogenasa
 NAD+ = Nicotinamida-adenina-dinucleótido.

Patologías asociadas

Si la concentración de la enzima en el suero es moderada, ésta proviene del citoplasma y, en menor medida, de las mitocondrias; si la concentración de la enzima está elevada en relación con fenómenos lesivos y necróticos de la célula, proviene en mayor medida de las mitocondrias, los valores más elevados de la AST se relacionan con los procesos necróticos del órgano.

La determinación de la AST es útil en presencia de un informe dudoso de electrocardiograma.

El aumento de la AST esta relacionado con patologías como el Infarto del miocardio (4 a 10 veces el valor normal paralelo al aumento de la CPK), arritmia severa, angina severa, hepatitis aguda; Cirrosis activa; necrosis hepática; Carcinoma primario o metastásico; MNI más HVA (10 a 100 veces de lo normal) y otras enfermedades: como la pancreatitis aguda; anemia hemolítica aguda; quemadura severa; embolia pulmonar; enfermedades renal aguda, distrofia muscular progresiva; gangrena, hipertermia maligna, trauma e irradiación de músculo esquelético. La AST puede aumentar en el envenenamiento por hongos (Amanita falloide), o por la absorción de algunos fármacos (isoniazide, rifampicina y algunos antibióticos). Por otra parte la disminución de la concentración de la ASAT entra relacionado con embarazo, beriberi y diabetes mellitus con acidosis.

En el infarto agudo de miocardio, se observa un aumento moderado de la enzima a las 6 u 8 horas de ocurrido el episodio, alcanza niveles máximos alrededor de las 48 horas y retorna a la normalidad entre el 6to y el 4to día. En los pacientes con afecciones hepáticas se observan las mayores elevaciones de AST, sobre todo en los casos de hepatitis con necrosis; con la determinación de la AST se mide la intensidad de la lesión hepática.

Muestreo

Suero. Estable de 4 a 8 °C durante 7 días).

Modalidad de solicitud

La modalidad de solicitud puede ser de carácter emergente y rutina (ayuna), con previa preparación del paciente, sin ninguna particularidad en la toma de muestra, verificar la idoneidad de la muestra en lo que es la identificación y cantidad, ictericia, hemólisis, lipemia, presencia de coágulos, filamentos de fibrina, turbidez. Señalar eventualmente en el resultado la no idoneidad de la muestra; transportar a temperatura ambiente; Centrifugar a 3000 r.p.m por 5 mnts y separar del suero; la toma de muestra se puede conservar por 1 día a temperatura ambiente de 20-25°C, 7 días a + 4°C, 1 año congelada.

Metódicas de determinación (cinético)

La enzima aspartato aminotransferasa (AST) o glutámico-oxalacética (TGO) cataliza la transferencia del grupo amino del aspartato al cetoglutarato, formando oxalacetato y glutamato. La concentración catalítica se determina empleando la reacción acoplada de la malato deshidrogenasa (MDH), a partir de la velocidad de desaparición del NADH. Tras el infarto, hay una liberación de proteínas intracelulares de las células dañadas. La primera en ser detectada es la troponina (5-10 h post infarto), seguida de la CK-MB (pico a 1 día), y finalmente la LDH, cuyo máximo se alcanza a los 2-3 días post infarto.

Reactivos: R1: AST/Buffer y R2: AST/NADH

Aplicación

Para la determinación de Aspartato-aminotransferasa en suero por método enzimático. " IN VITRO".

Control de Calidad

Se deberán usar sueros, control normal y patológico, en las mismas condiciones que las muestras.

Verificar el resultado

- Si el valor de la AST es ≥ 300.0 U/L, repetir la medida.
- Si el valor del resultado repetido es el mismo, se puede entregar.
- Si el valor del resultado repetido es diferente, procesar nuevamente la muestra utilizando un control patológico.
- Con valores de AST \geq de 800 U/L, repetir la medida, sea concentrada y diluida 1/2 con solución fisiológica y con un control patológico.

- Si
- la confrontación del valor concentrado está sobrepuesto al suero diluido y el control está dentro el rango establecido, se puede entregar el resultado.
- Si el suero diluido no está en relación con el suero concentrado, diluir la muestra $\frac{1}{4}$ o $\frac{1}{8}$ con solución fisiológica, siempre usando el control patológico.

Notas sobre la metódica

Linealidad: lineal hasta 800.0 U/L.

Sensibilidad: 4.0 U/L.

Especificidad: es específica para la AST.

Interferencias, Las más significativas son: Hemólisis: con Hb \geq 6.0 g/l.

Ictericia: con bilirrubina \geq 60.0 mg/dl. Lipemia: con triglicéridos \geq 1000.0 mg/dl.

Muchos fármacos (cefalosporina, cloranfenicol, rifampicina, isoniazide, alfametildopa) pueden dar valores elevados.

Criterios de validación

Controlar el valor de otras enzimas de los parámetros cardíacos (CPK, mioglobina, CK-MB, CK-MB masa, troponina).

Confrontar con analitos de funcionalidad hepática (ALT, GGT, TP, colinesterasa, electroforesis de proteína, parámetros de hepatitis A, B, C).

Controlar eventual estado tóxico (alcoholemia, colinesterasa).

Confrontar con pruebas de funcionalidad musculares (CPK, aldolasa). Y los resultados se escriben sin cifra decimal.

Comunicación de riesgo

Se tiene que comunicar inmediatamente con valores superior a 300.0 U/L.

Notas: Las muestras hemolizadas no deben usarse, ya que los eritrocitos presentan 7 veces más la actividad de ALAT en suero, y el fosfato de piridoxal puede elevar los niveles de la ALAT por activación de la apoenzima a partir de la transaminasa. Dicho reactivo puede encontrarse en agua contaminada por crecimiento microbiano. Así mismo, los niveles elevados de piruvato en suero, pueden interferir con el desempeño de la prueba. Young y colaboradores, han publicado una lista de drogas que interfieren en la determinación de la actividad de la ALT. Por otro lado, los reactivos contienen preservativos y otras sustancias que pueden ser dañinos. No ingerirlos y evitar contactos con piel y mucosas.

Control de calidad

Todos los sueros control con valores de ASAT determinados por este método pueden ser empleados.

➤ Enzima Transaminasa (TGP-ALT)

Generalidades

La alanina aminotransferasa (ALT) o transaminasa glutámica pirúvica(TGP) pertenece al grupo de las transaminasas, las cuales catalizan la transferencia del grupo amino (NH_2) de un aminoácido a su respectivos α ceto-ácido. La ALT tienen su localización celular en el citoplasma de las células del parénquima hepático por ello es una enzima unicelular, la ALT se encuentra en cantidad elevada en el tejido hepático, y en pequeña cantidad en el músculo, en el corazón y en el riñón, es por ello que en el daño celular leve, los valores de la ALT son más elevados y permanecen mayor tiempo aumentado respecto a la AST. El valores de referencia de la ALT oscila entre los 49 U/L.

Procedimiento del método

Mezclar 2 mL de reactivo con 200 μ L de muestra e incubar a 37 °C durante 1 min. Medir la variación de densidad óptica por minuto ($\Delta\text{DO}/\text{min}$) durante 3 min contra el blanco a 340 nm

Cálculo de la actividad de AST:

Actividad (U/L) = $\Delta\text{DO}/\text{min}$ x 1746

Donde:

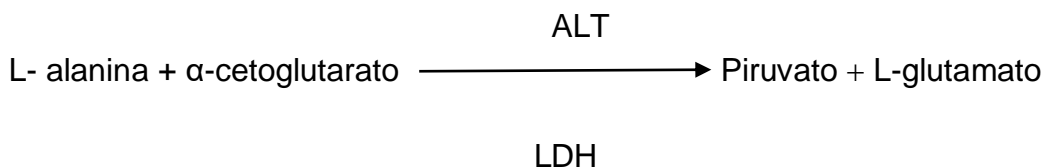
Actividad (U/L): actividad de AST de la muestra.

$\Delta\text{DO}/\text{min}$: variación de densidad óptica obtenida en los 3 min

1746: factor de actividad enzimática

Fundamento o principio del método

El piruvato formado en la primera reacción se reduce a lactato en presencia del lactato deshidrogenasa (LDH) y NADH; siendo la oxidación de este último proporcional a la actividad de la ALT, la cual se cuantifica por espectrofotometría a 340 nm (ó 334). según las reacciones que se describen a continuación:





ALT = Alanina-aminotransferasa

NADH = Dihidronicotinamida-adenina-dinucleótido

LDH = Lactato deshidrogenasa

NAD⁺ = Nicotinamida-adenina-dinucleótido

Patologías asociadas

La ALT se encuentra aumentada en la hepatitis viral aguda alcanzando valores superiores a los de la TGO, debido a que la extensión de la lesión celular es amplia, pero la lesión de la célula individual es ligera. En el caso de hepatitis virales, el aumento de ALT precede a la aparición de ictericia, alcanzando un nivel máximo luego de la observación de dicho síntoma. De persistir aumentados los valores después de 6 semanas ello se relaciona con una hepatitis crónica, con la determinación de la ALT se mide la extensión de la lesión hepática.

Muestreo

La solicitud puede ser de carácter emergente o de rutina (ayuna), con previa preparación del paciente, sin ninguna particularidad en la toma de muestra, verificar la idoneidad de la muestra en lo que es la identificación y cantidad, ictericia, hemólisis, lipemia, presencia de coágulos, filamentos de fibrina, turbidez. Señalar eventualmente en el resultado la no idoneidad de la muestra; transportar a temperatura ambiente; Centrifugar a 3000 r.p.m por 5 mnts y separar del suero; la toma de muestra se puede conservar por 1 día a temperatura ambiente de 20-25°C, 7 días a + 4°C, 1 año congelada.

Metódica de determinación (Cinético)

Se emplea los reactivos- ALT/bufer y ALT/NADH Para la determinación de Alanina-aminotransferasa en suero por método enzimático. "PARA USO INVITRO". Lineal hasta 600.0 U/L y específica para la determinación de TGP con una sensibilidad de 4,0 U/L.

Control de Calidad

Se deberán usar sueros, control normal y patológico, en las mismas condiciones que las muestras.

Verificar el resultado

- Si el valor de la ALT es >300.0 U/L, repetir la medida.
- Si el valor del resultado repetido es el mismo, se puede entregar.
- Si el valor del resultado repetido es diferente, procesar nuevamente la muestra, utilizando un control patológico.
- Con valores de ALT \geq de 600 U/L, repetir la medida, sea concentrada y diluida $1/2$ con solución fisiológica y con un control patológico.
- Si la confrontación del valor concentrado está sobrepuesto al suero diluido y el control está dentro el rango establecido, se puede entregar el resultado.
- Si el suero diluido no esta en relación con el suero concentrado, diluir la muestra $1/4$, $1/8$ con solución fisiológica, siempre usando el control patológico.

Interferencias

Las interferencias más significativas son: Hemólisis→ con Hb ≥ 6.0 g/l;

Ictericia→ con bilirrubina \geq 60.0 mg/dl; Lipemia→ con triglicéridos ≥ 1000.0 mg/dl;

Muchos fármacos (cefalosporina, cloranfenicol, rifampicina, isoniazide, alfametildopa) pueden dar valor elevado.

Criterios de validación

- Confrontar con analitos de funcionalidad hepática (AST, GGT, TP, colinesterasa, electroforesis de proteína, parámetros de hepatitis A, B, C).
- Controlar eventual estado tóxico (alcoholemia, colinesterasa).
- Confrontar con pruebas de funcionalidad musculares (CPK, aldolasa).
- Controlar parámetros serológicos para la mononucleosis infecciosa y para citomegalovirus.
- Controlar parámetros de las enzimas cardíacas (CPK, mioglobina, CK-MB, CK-MB masa, troponina).

Modo de escribir los resultados

La ALT se escribe sin cifra decimal.

Semiología

Aumento: Enfermedades hepatocelulares (de moderado a elevado incremento), Cirrosis activa (incremento medio), Neoplasia hepática, ictero obstructivo, Pancreatitis, Delirium Tremens, quemadura severa, trauma, shock, Hepatitis tóxica e infecciosa, Mononucleosis infecciosa, Infarto agudo del miocardio (puede no aumentar), por lo que, La determinación de la ALT está relacionada con las enfermedades del hígado. La ALT se encuentra muy elevada en las diferentes hepatitis virales (A, B, C, delta, E) con valores 20-50 veces más elevados con respecto a los valores de referencia. La ALT aumenta también en la mononucleosis infecciosa y citomegalovirus. Se puede verificar leve aumento de ALT en las miopatías, colagenopatía, hemopatía y pancreopatía.

Es útil el reporte de AST/ALT:

- En la obstrucción extrahepática, el aumento principal es el de la ALT.
- En la cirrosis, neoplasia del hígado, ictero hemolítico; en la hepatitis alcohólica, el aumento de la ALT es inferior a la AST.

Disminución: Aspirina o salicilatos.

Comunicación de riesgo

Se tiene que comunicar inmediatamente con valores superiores a 300.0 U/L.

➤ **Enzima Deshidrogenasa Láctica**

Generalidades

La lactato deshidrogenasa cataliza la oxidación anaeróbica de la glucosa por vía glucolítica (dehidrogenación del ácido láctico con formación de ácido pirúvico), estas se hallan presente en todos los tejidos, particularmente en el músculo cardíaco y el esquelético, hígado y riñón.

La enzima en circulación es una mezcla de 5 isoenzimas, las cuales difieren en su movilidad electroforética y sus pH óptimos.

- LDH-1 18-33 % : miocardio, eritrocitos, cerebro, músculos y riñón.
- LDH-2 24-40 % : miocardio, eritrocitos, cerebro, músculos y riñón.
- LDH-3 18-30 % : riñón y cerebro.
- LDH-4 6-16 % : hígado, músculos, riñón y pulmón.
- LDH-5 2-13 % : hígado, músculo, riñón y pulmón.

El valores de referencia de la LDH oscila entre los 250-580 U/L en niños y 230-460 U/l en adultos

Procedimiento del método

Mezclar 1 mL de reactivo con la muestra e incubar a 37 °C durante 1min. Leer la variación de absorbancia de la muestra ($\Delta DO/min$) durante 3 min contra agua purificada a 340 nm a 37 °C

Cálculo de la concentración de LDH

$$(U/L) = \Delta DO/min \times 8095$$

Donde:

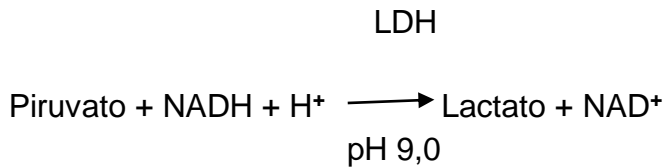
U/L: Actividad enzimática de LDH en la muestra

($\Delta DO/min$) = Variación de absorbancia de la muestra por minuto

8095: Factor de actividad enzimática.

Fundamento o principio del método

La L-lactato-deshidrogenasa (LDH) cataliza la reacción reversible de piruvato a lactato, en presencia de coenzima niacin adenin dinucleótido reducido dinucleótido de Nicotinamida y adenina(NADH), siguiendo el siguiente esquema de reacciones:



NADH → dinucleótido de Nicotinamida y adenina, forma reducida.

NAD⁺ → dinucleótido de Nicotinamida y adenina, forma oxidada.

La actividad de la enzima es proporcional a la oxidación del NADH la que se cuantifica por la disminución de la densidad óptica en la medida que va transcurriendo la reacción hasta 3 mnts.

Patologías asociadas

Por tanto, La determinación de la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) en suero, tiene una gran variedad de aplicaciones clínicas. En el caso del infarto agudo de miocardio (IAM), la actividad de LDH total junto con las de CK y GOT constituye un elemento importante de diagnóstico. La misma comienza a aumentar de 12 a 24 horas después de producido el infarto; alcanza un pico entre las 48-72 horas y permanece elevada hasta el 7^{mo} o 10^{mo} día. Por otra parte, también se registra un aumento de la actividad de LDH total en pacientes con necrosis hepática (producida por agentes tóxicos o por infecciones agudas como la hepatitis viral)

La determinación del LDH en el suero está indicada en el monitoreo del infarto del miocardio aumentando 10 veces los valores normales permanece elevado por un largo período ofreciendo así la posibilidad de hacer el diagnóstico del infarto regresando a la normalidad después de 7–15 días. La LDH también se emplea en el diagnóstico y monitoreo de enfermedades del hígado (hepatitis viral, cirrosis, carcinoma metastásico).

La actividad de la LDH se encuentran también aumentada en algunas hemopatías (anemia perniciosa, crisis hemolítica, etc.), en las neoplasias malignas, en caso de enfermedad reumática, en las leucemias agudas y crónicas, en el infarto cerebral, en el linfoma maligno y en la pericarditis tuberculosa.

Muestreo

Suero. Estable durante 48 horas a 2-8 °C.

Modalidad de solicitud

La solicitud puede ser de carácter emergente o de rutina (ayuna), con previa preparación del paciente, sin ninguna particularidad en la toma de muestra, verificar la idoneidad de la muestra en lo que es la identificación y cantidad, ictericia, hemólisis, lipemia, presencia de coágulos, filamentos de fibrina, turbidez. Señalar eventualmente en el resultado la no idoneidad de la muestra; transportar a temperatura ambiente; Centrifugar a 3000 r.p.m por 5 mnts y separar del suero; la toma de muestra se puede conservar por 1 día a temperatura ambiente de 20-25°C, 4 días a + 4°C, 6 semanas congelada.

Control de Calidad

Se deberán usar sueros, control normal y patológico, en las mismas condiciones que las muestras.

Verificar el resultado

- Si el valor de la LDH es < 100.0 U/L y ≥ 800.0 U/L, repetir la medida.
- Si el valor del resultado repetido es el mismo, se puede entregar.
- Si el valor del resultado repetido es diferente, procesar nuevamente la muestra utilizando un control patológico.
- Con valores de LDH \geq de 1200 U/L, repetir la medida, sea concentrada y diluida 1:2 con solución fisiológica y con un control patológico.
- Si la confrontación del valor concentrado está sobrepuesto al suero diluido y el control está dentro el rango establecido, se puede entregar el resultado.

- Si el suero diluido no está en relación con el suero concentrado, diluir la muestra 1/4, 1/8 con solución fisiológica siempre usando el control patológico.

Interferencias

Las interferencias más significativas son: Hemólisis→ con Hb > 2.0 g/l; Ictericia→ con bilirrubina > 60.0 mg/dl; Lipemia→ con triglicéridos > 1000.0 mg/dl y también el paracetamol puede interferir.

Criterios de validación

- Controlar el valor de otras enzimas de los parámetros cardíacos (CPK, TGO, mioglobina, CK-MB, CK-MB masa, troponina).
- Confrontar con analitos de funcionalidad hepática (TGP, GGT, TP, colinesterasa, electroforesis de proteína, parámetros de hepatitis A, B, C).
- Controlar eventual estado tóxico (alcoholemia, colinesterasa).
- Controlar parámetros tumorales.
- Controlar biometría hemática completa.
- Confrontar con pruebas de funcionalidad musculares (CPK, aldolasa).
-

Modo de escribir los resultados

La LDH se escribe sin cifra decimal.

Semiología

Aumento: Infarto del miocardio: La elevación de la LDH en el infarto del miocardio es caracterizada por: altos niveles (2 a 10 veces por encima de lo normal) en las 12 a 24 horas del infarto. La elevación continúa en los 6 a 10 días (más que la TGO y la CPK), por tal razón es utilizada para el diagnóstico tardío del infarto; retornando a la normalidad entre los 8 y 14 días, Infarto pulmonar: Usualmente hay un incremento de la LDH a las 24 horas de iniciado el dolor.

Condiciones generales del incremento en los niveles

- Incremento importante (2 a 40 veces) en anemias megaloblásticas; Shock y anoxia; Cáncer; infarto de miocardio (LDH1), hepatitis víricas (LDH4, LDH5)
- Incremento moderado (2 a 4 veces) en Infarto miocardio; Infarto pulmonar; Leucemia granulocítica; Anemia Hemolítica;

Mononucleosis infecciosa; Distrofia muscular progresiva, accidente cerebro-vascular, 5' nucleotidasa (NTP)

- Incremento ligero en delirium Tremens, hepatitis, cirrosis, íctero obstructivo, mononucleosis, hemólisis, shock y anoxia, La angina y la pericarditis no producen elevación de la LDH.
- Elevación urinaria en el Cáncer de riñón o de próstata, Glomerulonefritis, Hipertensión maligna, Lupus nefrítico, Necrosis tubular aguda, Trasplante renal, Pielonefritis(a veces).

La disminución es una buena respuesta a la terapia contra el cáncer.

Comunicación de riesgo

Se tiene que comunicar inmediatamente con valores superior a 800.0 U/L

➤ Enzima γ -glutamyl transferasa (GGT)

Generalidades

La γ -glutamyl transferasa (GGT) es una enzima del grupo de las peptidasas, las cuales catalizan el rompimiento hidrolítico de los péptidos para formar aminoácidos o péptidos más pequeños. Específicamente, la GGT cataliza la transferencia de grupos γ -glutamyl de péptidos de distinto tamaño, hacia moléculas aceptoras de péptidos. Aún cuando los niveles más elevados de GGT están localizados en los tejidos renales, la fuente de las enzimas presentes en suero es de origen hepático. también está presente en muchos órganos como el riñón, páncreas, pulmón, bazo, intestino y tiroides. Por ser la GGT una enzima de membrana ampliamente distribuida en el organismo su actividad es influenciada por cualquier factor que afecte a las membranas celulares de los órganos que la contienen. El valor de referencia de la GGT oscila en mujeres de 5 a 32 U/L (0,083 a 0,533 μ Kat/L) y en hombres de 10 a 45 U/L (0,1667 a 0,750 μ Kat/L)

Procedimiento técnico del método

Mezclar 2mL de reactivo con 200 μ L de muestra e incubar a 37 °C durante 1 min. Leer la variación de absorbancia de la muestra (Δ DO/min) durante 3 min contra agua purificada a 405 nm a 37 °C.

Cálculo de la concentración de la GGT

(U/L) = Δ DO/min x 1158

Donde:

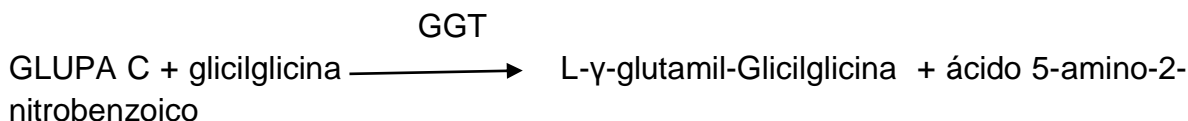
U/L: Actividad enzimática de GGT en la muestra

(Δ DO/min) = Variación de absorbancia de la muestra por minuto

1158: Factor de actividad enzimática

Fundamento o principio del método

La γ -glutamyltransferasa (GGT) cataliza la transferencia del grupo glutamilo de la L- γ -glutamyl-3- carboxy-p-nitroanilida (GLUPA C) a la glicilglicina, con la formación del ácido 5-amino-2-nitrobenzoico, de acuerdo a la siguiente reacción:



El ácido 5-amino-2-nitrobenzoico formado es proporcional a la actividad de GGT presente en la muestra y su determinación se efectúa por espectrofotómetro a 405 nm.

Patologías asociadas

Los niveles elevados de esta enzima están asociados con desórdenes hepatobiliares y pancreáticos; también se presentan en alcohólico. En el caso de alteraciones hepáticas, la GGT generalmente es índice de agresión tóxica adquiriendo valor clínico su determinación cuando es comparado con los de otras enzimas de mayor especificidad, siendo por tanto útil para el diagnóstico y seguimiento de las patologías hepáticas.

El aumento más elevado de la GGT se encuentra relacionado con la obstrucción de las vías biliares, su determinación es importante en el diagnóstico de la metástasis hepática, para la identificación del alcoholismo y para el monitoreo de la abstinencia al alcohol en la terapia de desintoxicación.

Muestreo

Suero- estable durante 8 h a 15 °C ó 3 días a 2-8 °C, o un mes a -20 °C.

Modalidad de solicitud

La solicitud puede ser de carácter emergente o de rutina (ayuna), no es necesario la previa preparación del paciente, sin ninguna particularidad en la toma de muestra, verificar la idoneidad de la muestra en lo que es la identificación y cantidad, ictericia, hemólisis, lipemia, presencia de coágulos, filamentos de fibrina, turbidez. Señalar eventualmente en el resultado la no idoneidad de la muestra; transportar a temperatura ambiente; Centrifugar a 3000 r.p.m por 5 mnts y separar del suero; la toma de muestra se puede conservar por 3 día a temperatura ambiente de 20-25oC, en 7 días a 2- 4oC y 1 año en congelada.

Modo de escribir los resultados

La γ -GT se escribe sin cifra decimal

Interferencias

Las interferencias más significativas son: Hemólisis→ con Hb >1.5 g/l; Ictericia→ con bilirrubina >40.0 mg/dl; Lipemia→ con triglicéridos >2000.0 mg/dl; Muchos antibióticos pueden dar valores elevados.

Criterios de validación

- Confrontar con analitos de funcionalidad hepática.
- Confrontar con parámetros de estasis biliar (bilirrubina, fosfatasa alcalina).
- Controlar eventual estado tóxico (alcoholismo).
- Controlar eventual absorción de terapia con antibióticos.
- Controlar parámetros serológicos para la mononucleosis infecciosa y el citomegalovirus.

Semiología

Aumento: Colecistitis, Colelitiasis, Cáncer metastásico del hígado, Cirrosis hepática, Pancreatitis, Cáncer de los conductos biliares, Alcoholismo, Uso de barbitúricos, Obstrucción del tracto biliar.

- Aumento importante en hepatitis vírica, obstrucción biliar, metástasis hepáticas, enfermedades alcohólicas.
- Aumento moderado en infecciones que afectan al hígado (citomegalovirus, mononucleosis infecciosa).

➤ Enzima Creatina quinasa (CK o CPK)

Generalidades

La creatina quinasa cataliza la reacción reversible entre creatina y ATP, para formar fosfato de creatina y ADP. La creatina-quinasa (CK o CPK) es una enzima intracelular localizada en mayor proporción en músculos cardíaco y esquelético y también en cerebro, pudiendo encontrarse tres principales isoenzimas con formas moleculares distintas (CK – MM; CK – MB y CK – BB) distribuidas de tal forma que exista cantidades elevadas de CK en músculos esqueléticos casi exclusivamente, bajo la fórmula de CK-MM, y con pequeñas cantidades de CK-MB (1-3.0%), en el cerebro y el intestino; en la vejiga, está presente como enzima CK–BB. En el músculo cardíaco, están bien representadas dos de las tres isoenzimas citoplasmáticas, la CK–MM y la CK-MB.

La CK se encuentra distribuida en varios órganos, registrándose su actividad más alta en músculo esquelético, corazón y cerebro.

El valor de referencia de la CK o CPK oscila en mujeres de 24 a 170 U/L y en hombres de 24 a 195 U/L

Procedimiento del método

Mezclar 1 mL de reactivo con 40 µL de muestra e incubar a 37 °C durante 2 min. Leer la variación de absorbancia de la muestra durante 3 min contra agua purificada a 340nm a 37 °C.

Cálculo de la concentración de CK

$$U/L = \Delta Abs/min \times 4127$$

Donde:

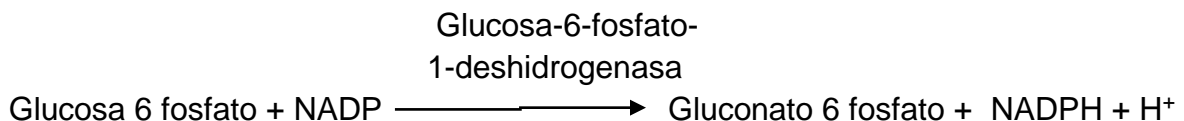
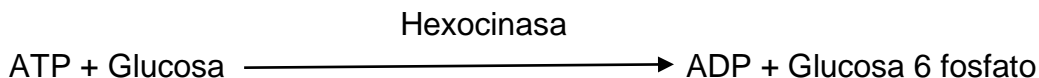
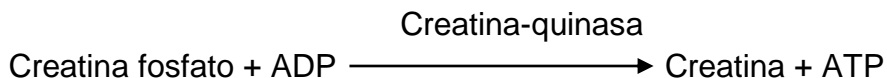
U/L: Actividad enzimática de CK en la muestra

$\Delta Abs/min$: Variación de la absorbancia de la muestra por minuto

4127: Factor de actividad enzimática

Fundamento o principio del método

La creatina quinasa cataliza la fosforilación del ADP por el fosfato de creatina a ATP. La concentración catalítica de la CK se determina empleando las reacciones acopladas de la hexoquinasa y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, a partir de la velocidad de formación del NADPH a 340 nm según el esquema de reacciones:



Patologías asociadas

La determinación de la actividad enzimática de la creatina quinasa total ayuda en el diagnóstico de distrofias musculares y otras enfermedades del músculo esquelético, permite el diagnóstico presuntivo del infarto (IAM); también está presente en patologías relacionadas con afecciones gastrointestinales, renales, en mujeres en estado de gestación, problemas de próstata, hígado, entre otros.

En el infarto del miocardio agudo (IMA), la CPK aumenta precozmente normalmente después de 4-6 horas a partir de la sintomatología, alcanzando los máximos niveles entre las 18-24 horas; disminuyendo entre los 3-4 días. El interés de esta determinación es que sirve para el diagnóstico precoz del infarto que se puede confirmar con la AST.

Muestreo

Suero, plasma heparinizado ó con EDTA)

La solicitud puede ser de carácter emergente o de rutina (ayuna) explicando obligatoriamente el diagnóstico, con previo preparación del paciente en el sentido de evitar el estrés muscular en los días antes de la toma de la muestra, verificar la idoneidad del muestreo en lo que es la identificación, hemólisis, lipemia, presencia de coágulos, filamentos de fibrina, turbidez. Señalar eventualmente en el resultado la no idoneidad de la muestra; transportar a temperatura ambiente; Centrifugar a 3000 r.p.m por 5 mnts y separar del suero; la toma de muestra se puede conservar por 1 día a temperatura ambiente de 20-25⁰C, 10 días en la oscuridad a + 4⁰C, se inactiva en congelación.

Metódica de determinación: (cinética UV y procedimiento analítico)

Se emplea los reactivos- CK/HK y CK/G6PDH Para la determinación de LA creatin cinasa en suero por método enzimático por espectrofotometría a 340 nm. "PARA USO INVITRO". Lineal en un rango de la concentración de la CK de 10 a 1800.0 U/L y específica para la determinación de CK, sensible hasta 5,0U/L.

Interferencias

Hemólisis: con Hb > 1.0 g/l (muy sensible).

Ictérico: bilirrubina > 60.0 mg/dl (poco significativo).

Lipemia: triglicéridos > 1000.0 mg/dl

Criterio de validación

Controlar todos los otros parámetros cardíacos: LDH, TGO, CPK-MB, mioglobina y troponina.

Confrontar parámetros musculares: LDH, aldolasa.

Controlar parámetros de funcionalidad hepática: TGP, GGT, TP, colinesterasa, parámetros de hepatitis A y B.

Controlar eventuales parámetros tóxicos (alcoholemia y colinesterasa).

Controlar parámetros tumorales.

Modo de escribir los resultados

La CPK se escribe sin cifras decimales.

Comunicación de riesgo

Se tiene que comunicar inmediatamente con valores ≥ 400.0 U/L.

Semiología:

Aumento: Infarto del Miocardio (4 a 6 horas), Otras enfermedades que producen incremento de la CPK: Enfermedades cerebro-vasculares agudas, Distrofia muscular progresiva (de 300-400 veces lo normal), Dermatomiositis, Delirium tremens, Alcoholismo crónico, Shock eléctrico, Mixedema, Cirugía cardíaca, Desfibrilación cardíaca, Convulsiones, infarto cerebral, isquemias, o hemorragias subaracnoidea, Hipotiroidismo, Psicosis aguda, Trauma del sistema nervioso central, Infarto o edema pulmonar.

➤ Enzima Creatina quinasa, Isoenzima MB(CK-MB)

Generalidades

La creatina quinasa(CK) es una enzima intramuscular constituida por una subunidad M (músculo) y otra subunidad B que se combinan dando lugar a las isoenzimas CKMM (muscular), CKBB (cerebral) y CKMB (miocárdica). Por su vez la CK-MB está formada por las subunidades CK-B y CK-M. La fracción CK-M está inhibida por un anticuerpo específico que no influye en la fracción CK-B. La restante actividad de esta fracción que corresponde a la actividad de la CK-MB es determinada mediante técnica cinética. El valor de referencia de la CK-MB se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ CK-MB} = \frac{(\text{CK-MB} \times 100)}{\text{Total CK}}: 6-25\%$$

Procedimiento del método

Mezclar 1mL de reactivo con 40 μ L e incubar a 37 °C durante 2 min y leer la variación de absorbancia de la muestra durante 3 min a 340nm contra agua purificada a 37 °C

Cálculo de la concentración de CK-MB.

$$U/L = \Delta \text{Abs}/\text{min} \times 8254$$

Donde:

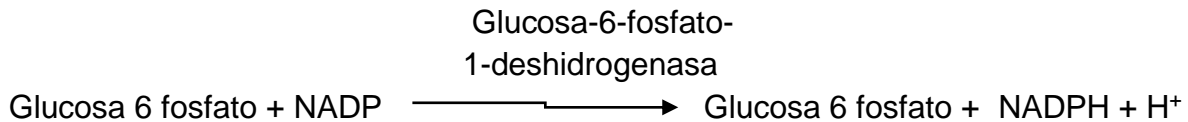
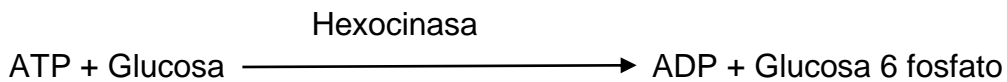
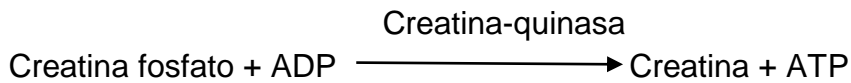
U/L: Actividad de CK-MB en la muestra

Δ Abs/min: Variación de absorbancia de la muestra por minuto

8254: Factor de actividad enzimática

Fundamento o principio del método

La determinación de CK-MB en suero se basa en la inhibición específica de las subunidades CK-M por anticuerpos policlonales anti CK-MM. Los anticuerpos inhiben tanto la isoenzima MM como las subunidades M correspondientes a la CK-MB. La determinación de la actividad enzimática de las subunidades B se realiza midiendo la velocidad de formación de NADPH a 340 nm según el esquema de reacciones siguiente:



Patologías asociadas

La elevación sérica de CK y de CK-MB constituye un indicador de injuria (disminución del riego sanguínea) de miocardio. Este tipo de isoenzima se encuentra en las células del músculo cardíaco siendo un marcador fundamental en las cardiopatías; también es posible detectarla en inflamaciones y enfermedades musculares degenerativas, shock, hipotiroidismo, psicosis aguda y en las mujeres inmediatamente después del parto. Esta determinación compete especialmente a las especialidades de cardiología y endocrinología. Con este producto es posible realizar estudios de pronóstico, diagnóstico y/o seguimiento de una enfermedad o condición clínica específica.

Metódica de determinación

Cinética inmunológica y procedimiento analítico

Criterio de validación

El CK-MB, la troponina y la mioglobina son los parámetros más importantes en el diagnóstico del infarto al miocardio agudo; menor importancia la tiene la TGO y LDH, y algunos factores de la coagulación, como el fibrinógeno. Debido a que la CK-MB está presente de modo particular en el miocardio, su mayor aumento del 6.0% del CK total indica la presencia de un daño a cargo del miocardio.

Comunicación de riesgo

Se tiene que comunicar inmediatamente con valores > 100.0 U/L y/o además el 25.0% del CK- total. En caso que la fracción MB sea superior al CK- total, comunicar al médico para verificar si existe una condición patológica que justifique ese resultado.

Observaciones

Antes de la determinación de la **CK-MB**, se determina la actividad de la CPK total, para asegurar correctamente la interpretación diagnóstica del resultado. Diluir las muestras, 1/10, si son superiores a 1000 U/l. En los restantes puntos de la descripción, se debe seguir las mismas instrucciones como en la CK-total.

➤ Enzima Fosfatasa Alcalina (AP)

Generalidades

La fosfatasa alcalina es un grupo de enzimas que cataliza la hidrólisis del ligamiento estérico, entre álcali y ácido fosfórico, con liberación de fosfato inorgánico. La de origen humano hidroliza todos los monoésteres ortofosfóricos. Esta enzima está presente en casi todos los tejidos y fluidos humanos, especialmente en los huesos, mucosa intestinal, hígado, bazo, pulmones, riñón y tiroides. Los niveles normales de fosfatasa alcalina dependen de la edad, incrementándose sus concentraciones durante el período de crecimiento de huesos, oscilando sus valores de referencia de 180 a 1200 U/L en niños y de 100 a 290 U/L en adultos. La AP en el adulto proviene en parte del hígado y en parte del hueso, sistema reticuloendotelial y vascular, dando lugar a distintas isoenzimas.

Procedimiento del método

Mezclar 2mL de reactivo con 40 de la muestra e incubar a 37 °C durante 1 min. Medir la variación de densidad óptica por minutos ($\Delta DO/min$) durante 3 min a 37 °C contra el blanco a 405 nm.

Cálculo de la actividad de Fosfatasa Alcalina

Actividad (U/L) = $\Delta DO/\text{min} \times 2750$

Donde:

Actividad (U/L): actividad de Fosfatasa alcalina en la muestra.

$\Delta DO/\text{min}$: variación de densidad óptica obtenida en los 3 min.

2750: factor de actividad enzimática.

Se debe comprobar el factor, con los controles, cada vez que se realice por primera vez el procedimiento

Fundamento o principio del método

La AP cataliza la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato, produciendo p-nitrofenol y ácido fosfórico inorgánico. La reacción se interrumpe con hidróxido de sodio que convierte el p-nitrofenol en ión paranitrofenilato. La actividad de la AP en la muestra es proporcional al p-nitrofenol obtenido el cual se determina espectrofotométricamente según las reacciones que se describen a continuación:

AP

p-nitrofenilfosfato + H₂O-----→ p- nitrofenol + fosfato inorgánico

Patologías asociadas

El aumento de la fosfatasa alcalina se encuentra en:

Enfermedad del hígado por un aumento de la fracción hepática por obstrucción de la vía biliares; hepatopatías celulares; hepatopatía obstructiva.

Enfermedad ósea por un aumento de la fracción ósea, debido a la incrementada actividad; de los osteoblastos (raquitismo, enfermedad de Paget, hiperparatiroidismo, osteomalacia, neoplasia del tejido óseo, trauma o fracturas ósea).

Por ello, una elevación moderada de ALP no atribuida a hígado o huesos, puede deberse a la enfermedad de Hodgkins, e infecciones bacterianas abdominales.

La disminución de la fosfatasa alcalina se origina en la disminución del magnesio, porque éste es el ión necesario para la actividad de la fosfatasa alcalina. Por tanto, Entre las patologías que afectan la actividad sérica de fosfatasa alcalina, se pueden citar: carcinomas metastásicos en hígado y en hueso (productores de enzimas), colestasis biliar, fenómenos osteoblásticos, trastornos de malabsorción acompañados de lesiones ulcerosas e incluso lesiones en vías de reparación tales como infarto agudo de miocardio, infarto pulmonar o renal.

Muestreo

Suero- evitar anticoagulantes como citratos, oxalatos y EDTA

La solicitud es solamente de carácter rutinaria en ayuna , con previo preparación del paciente en el sentido de evitar el estrés muscular en los días antes de la toma de la muestra, verificar la idoneidad del muestreo en lo que es la identificación, hemólisis, lipemia, presencia de coágulos, filamentos de fibrina, turbidez. Señalar eventualmente en el resultado la no idoneidad de la muestra; transportar a temperatura ambiente; Centrifugar a 3000 r.p.m por 5 mnts y separar del suero; la toma de muestra se puede conservar por 2 día a temperatura ambiente de 20-25⁰C, 7 días en la oscuridad a 2 - 4⁰C, 4 semanas en congelación a -20⁰C.

Método de determinación

Ensayo cinético optimizado. Metodica DGKC)

Se emplea los reactivos- FAL /Dietanolamina y : FAL/p-nitrofenilfosfato Para la determinación de Fosfatasa alcalina en suero por método enzimático por espectrofotometria UV a 405 nm. "PARA USO INVITRO". Lineal en un rango de la concentración de la FAL de 10 a 700.0 U/L y específica para la determinación de FAL.

Interferencias

Las interferencias más significativas son:

Hemólisis: con Hb \geq 2.0 g/l (porque la fosfatasa alcalina se encuentra en los glóbulos rojos); Ictericia: con bilirrubina \geq 60.0 mg/dl;

Lipemia: con triglicéridos \geq 2000.0 mg/dl; La presencia de oxalato, citrato y EDTA puede disminuir la actividad de la fosfatasa alcalina por la pérdida de iones de magnesio.

Criterios de validación

Controlar la edad del paciente; Confrontar con funcionalidad del hígado (transaminasa, TP, colinesterasa), parámetros de estasis biliares (bilirrubina, GGT), parámetros del metabolismo óseo (calcio, fósforo), el valor del magnesio; Controlar eventual estado tóxico (alcoholismo) y los parámetros de hepatitis.

Los resultados se escriben sin cifras decimales.

Control de calidad

Todos los sueros control con valores de ALP determinados por este método pueden ser empleados.

➤ Enzima Fosfatasa Ácida (SP)

Generalidades

La fosfatasa ácida está constituida por un grupo de enzimas, las cuales hidrolizan los ésteres fosfóricos en ambiente ácido. El pH óptimo de la actividad enzimática oscila entre 4.8 – 6.0. La de origen humano hidroliza todos los monoésteres ortofosfóricos. La concentración más elevada de la SP se localizándose en la próstata donde las glándulas prostáticas secretan cerca de 100 veces más que en otros tejidos bajo el estímulo de la testosterona. Normalmente, la fosfatasa ácida se encuentra en el plasma sólo en pequeña cantidad, proveniente de los glóbulos rojos y plaquetas.

Los valores de referencia de la SP para mujeres pueden alcanzar hasta 4.2 U/l y en hombre hasta 5.4 U/l.

Procedimiento del método

Mezclar y esperar 5 minutos a 37 °C. Anotar la lectura a **405 nm** y poner en marcha el cronómetro. Repetir la lectura a 1, 2 y 3 minutos. Calcular el valor medio del aumento de extinción por minuto ($\Delta E/\text{min}$).

Cálculo

Fosfatasa Ácida Total (U/l) = $\Delta E/\text{min} \times 750$

Fosfatasa Ácida Prostática (U/l) = ($\Delta E/\text{min}$ fosfatasa ácida total - $\Delta E/\text{min}$ fosfatasa ácida. No inhibida por tartrato) $\times 750$

(Se debe comprobar el factor, con los controles, cada vez que se realice por primera vez el procedimiento).

Fundamento principio del método cinético colorimétrico

La SP a pH 5.0 cataliza la hidrólisis de el α naftilfosfato o fosfato inorgánico a α naftol el cual se hace reaccionar con una sal de diazonio (Fast Red TR), formándose el cromogeno azoico; compuesto coloreado cuya concentración es proporcional a la actividad de la SP, midiéndose su absorbancia a 405 nm.

α - naftilfosfato + H₂O -----→ α naftol + fosfato

α - naftol + Fast Red TR -----→ cromogeno azoico

Patologías asociadas

La determinación de la fosfatasa ácida está correlacionada a las enfermedades neoplásicas de la próstata, especialmente en los enfermos con metástasis ósea.

Se puede encontrar aumento de la fosfatasa ácida en: alteraciones de los eritrocitos (anemias), alteraciones de los leucocitos (leucemia), alteraciones de las plaquetas, cáncer metastásico de próstata y en hiperparatiroidismo.

Muestreo

Solamente suero, no el plasma

Modalidad de solicitud

La solicitud es solamente de carácter rutinaria en ayuna, con previo preparación del paciente en el sentido de evitar el estrés muscular en los días antes de la toma de la muestra, verificar la idoneidad del muestreo en lo que es la identificación, hemólisis, lipemia, presencia de coágulos, filamentos de fibrina, turbidez. Señalar eventualmente en el resultado la no idoneidad de la muestra; transportar a temperatura ambiente; Centrifugar a 3000 r.p.m por 5 mnts y separar del suero; Ejecutar el examen cuantos antes o añadir el ácido acético. La toma de muestra se puede conservar por 2 día a temperatura ambiente de 20-25⁰C, 8 días a +4⁰C, 2 meses en congelación a -20⁰C.

Metódica colorimétrica y procedimiento de determinación

Ensayo cinético colorimétrico. Método de Hillmann modificado.

Notas: Los demás procederes coinciden con los de la Fosfatasa alcalina.

Particularidades

Enzimas séricos en la enfermedad cardiaca

- Creatín fosfoquinasa (CPK) < 160 U/L (Isoenzima "mb"); Láctico deshidrogenasa (LDH) < 120-230 U/L; isoenzima 1 (15-25%); Aspartato aminotransferasa (AST; GOT) < 40 U/L

Enzimas séricos en la enfermedad hepática

- Alanina aminotransferasa (ALT; GPT) < 50 U/L; Aspartato aminotransferasa (AST; GOT) < 40 U/L; Lactato deshidrogenasa < 90 U/L (isoenzima 5); γ glutamil transpeptidasa (GGT) < 50 U/L; Fosfatasa alcalina < 70 U/L; Fosfatasa ácida < 0.6 U/L; 5' nucleotidasa < 5 U/L.

2.1.2 Las enzimas como Medio de Diagnóstico en el Laboratorio de Anatomía Patológica.

Los términos histoquímica y citoquímica (citoquímica) se emplean generalmente para indicar los métodos de localización de diversas moléculas en los cortes de tejidos. Dichos métodos se basan en reacciones químicas específicas o en la interacción macromolecular de alta afinidad. En ambos casos, el resultado final consiste en la producción de compuestos insolubles, teñidos o

electrodensos que permiten localizar sustancias específicas en los cortes de los tejidos (iones de hierro, fosfatos, ácidos nucleídos, células, lípidos, glúcidos, glicoproteínas, enzimas y etc) con el empleo de la microscopia óptica o electrónica.

La histoquímica enzimática se basa en la determinación de enzimas tisulares mediante reacciones químicas de oxidación reducción a diferencia de la inmunohistoquímica que se basa en la reacción antígeno-anticuerpo.

Entre las técnicas de inmunohistoquímica de tinción histológica o inmunotinción esta la inmunohistoquímica enzimática en la cual las enzimas son utilizadas para el marcaje de anticuerpos pues estas se pueden detectar mediante la utilización de sustratos y cromógenos que dan lugar a productos coloreados insolubles, que forman un precipitado en el lugar en el que se encuentra el anticuerpo.

Entre los cromógenos posibles a utilizar en la inmunohistoquímica enzimática se encuentran la diaminobenzidina (color pardo), el aminoetilcarbazol (color rojo) y el nitroazul de tetrazolio (color azul).

A continuación se describe a modo de ejemplo tres enzimas detectables por métodos citohistoquímicos, tanto por microscopio óptico o electrónico:

➤ **Enzima Fosfatasa ácida**

Generalidades

La fosfatasa ácida es una enzima que se halla en los riñones, en el suero, en el semen y su mayor concentración se halla en la próstata. Se eleva en el cáncer de próstata y en los traumatismos. Uno de los métodos para detectar la actividad de la fosfatasa ácida es el de Gomori, que consiste en incubar cortes de tejidos fijados en formol en una solución que contiene glicerofosfato sódico y nitrato de plomo en tampón con pH 5,0.

Fundamento del método

Gracias a la acción de la enzima que produce la hidrólisis del glicerolfosfato con liberación de iones fosfatos que reaccionan con el nitrato de plomo formando fosfato de plomo insoluble, que se precipita en el lugar donde hay actividad enzimática. En una segunda fase del método se procede a sumergir los cortes en una solución de sulfato de amonio que transforma el precipitado incoloro de

fosfato de plomo en un precipitado negro y electrodensos de sulfato de plomo. Este método se utiliza mucho para localizar lisosomas que son orgánulos ricos en fosfatasa alcalina.

➤ **Enzima Deshidrogenasas**

Generalidades

Las deshidrogenasas son enzimas que extraen el átomo de hidrógeno de un sustrato, transformándolo en otro compuesto (procesos de oxidación). Hay muchas deshidrogenasas diferentes que se distinguen por la naturaleza del sustrato sobre el que actúan, y desempeñan un papel importante en el metabolismo celular.

La demostración histoquímica de estas se realiza en cortes de tejidos no fijados en una solución que contiene el sustrato adecuado y tetrazol, compuesto receptor de H^+ y claramente teñidos.

Fundamento del método

Bajo la acción de la enzima, el sustrato cede hidrógeno que es transferido al **tetrazol**, reduciéndolo a un compuesto fuertemente teñido e insoluble denominado **formazana** que precipita en el de la actividad enzimática. De esta manera se puede visualizar la actividad de la succinodeshidrogenasa, enzima muy activa del ciclo de Krebs.

➤ **Enzima Peroxidasa**

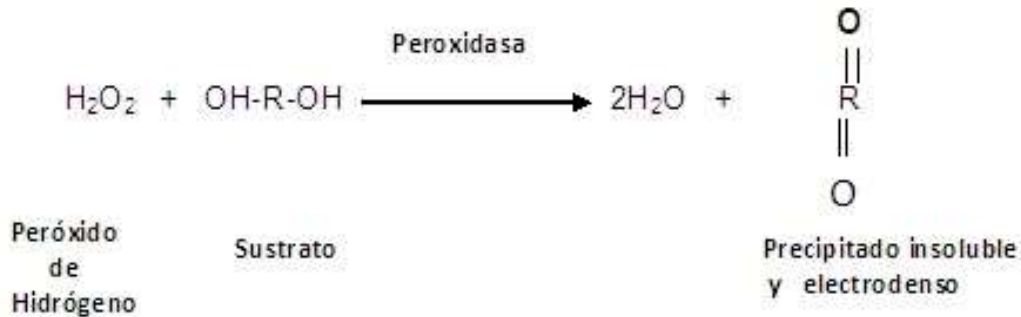
Generalidades

Es una enzima que está presente en diferentes tipos celulares, estimula la oxidación de ciertos compuestos por el peróxido de hidrógeno (agua oxigenada).

Principio del método

Se produce la transferencia de iones de hidrógeno al peróxido de hidrógeno formándose moléculas de agua. Por ejemplo al incubar cortes de tejidos adecuadamente fijados en 3,3'-diaminoazobencidica (DAB) en presencia de agua oxigenada, el DAB es oxidado produciéndose una sustancia insoluble, teñida y electrodensa. Por tratarse de una enzima extremadamente activa en un corto intervalo de tiempo se producen cantidades apreciables de precipitado insoluble.

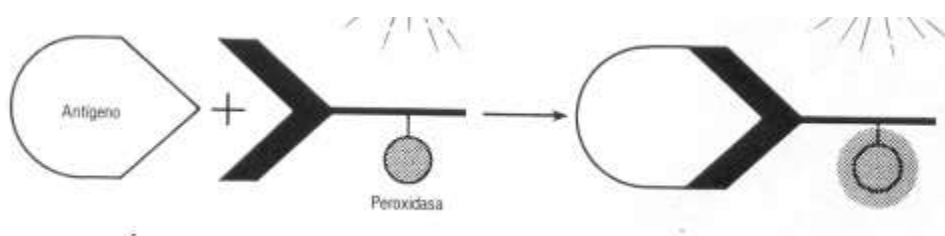
Por tanto, con este método pueden localizarse las estructuras con actividad peroxidásica tanto al microscopio óptico o electrónico y es un método muy sensible.



La técnica de DAB es la más utilizada en histoquímica, ya que permite por ejemplo detectar peroxidasas en los leucocitos, lo que facilita el diagnóstico de las leucemias, y en las técnicas de inmunohistoquímica como marcadores y en hibridación molecular.

Revelado de la Peroxidasa

Uno de los pasos a desarrollar en la técnica de inmunohistoquímica enzimática de vital importancia es el revelado de la peroxidasa, para lo cual se mezcla el sustrato agua oxigenada (H₂O₂) con el cromógeno diaminobenzidina (DAB) que al oxidarse hace que la benzidina deje un pigmento pardo oscuro que será el color que tomara el sitio de la reacción antígeno-anticuerpo. Como se observa a continuación:



Por tanto en las técnicas de inmunohistoquímica, el anticuerpo se conjuga a la peroxidasa para catalizar la reacción con el antígeno posibilitando de este modo la localización del anticuerpo.

La peroxidasa es una enzima que normalmente se encuentra en los tejidos humanos principalmente en la células del sistema hematopoyético por ello cuando empleamos esta enzima como trazador o marcador de la reacción antígeno anticuerpo se debe eliminar esta peroxidasa endógena para evitar errores en los resultados de la técnica, esta es eliminada mediante el bloqueo de la peroxidasa endógena durante el cual le es aplicado a la lámina con el corte de tejido H_2O_2 antes de aplicar el ácido primario

Desenmascaramiento antigénico o reanimación antigénica.

Por otra parte se debe tener en cuenta que los tejidos fijados tienden a enmascarar las moléculas antigénicas debido al intercambio proteico que se produce entre el formaldehído y las proteínas tisulares, por ello estos antígenos no pueden ser reconocidos específicamente por el anticuerpo aplicado por lo que se debe llevar a cabo el desenmascaramiento antigénico o reanimación antigénica; técnica que se realiza con el propósito de romper las uniones químicas inducidas por el formol, desbloqueándose de esta manera el acceso de los anticuerpos a los epitopes de los antígenos.

El desenmascaramiento antigénico se puede llevar a cabo mediante técnicas enzimáticas o mediante el uso del calor

El desenmascaramiento antigénico mediante técnicas enzimáticas se comenzó a realizar con enzimas proteolíticas como la tripsina, pronasa y pepsina. El uso de esta técnica tiene sus desventajas pues es difícil la estandarización, las concentraciones de la enzima dependen del tipo de fijador empleado y del tejido, el tiempo de incubación es variable y existe una escasa reproducibilidad.

Para el desenmascaramiento antigénico mediante el uso del calor se debe tener en cuenta algunas variables técnicas como: el tipo de fuente de calor a utilizar (horno de microondas, olla de presión, vaporizadores, autoclave); tipo de solución de desenmascaramiento, tiempo de incubación y distintos ciclos. Entre las ventajas de esta técnica se encuentra el hecho de ser más reproducibles, de mejor inmunotinción, mejora la limpieza del fondo y permite diluciones más altas de los anticuerpos.

Siempre que se proceda al desenmascaramiento de los anticuerpos independientemente de la técnica por la que se realice se deben utilizar láminas portaobjetos pre-tratadas para que los cortes de las biopsias se adhieran firmemente a la lámina y no se desprendan durante los procedimientos utilizados. Una

vez llevado a cabo el bloqueo de la peroxidasa endógena y el desenmascaramiento antigénico se tendrá listo el tejido para aplicar el anticuerpo primario.

En las técnicas de hibridación se utiliza la peroxidasa por el proceso de diaminoazobencidina (DAB) para la determinación de las lecitinas, proteínas obtenidas fundamentalmente de semillas de plantas que se unen con gran afinidad a los glicoproteínas, proteoglicanos y glucolípidos de la superficie celular y se utilizan ampliamente para caracterizar moléculas de membrana que contienen ciertos glúcidos.

A continuación se muestran las Ventajas y desventajas de las técnicas en inmunohistoquímica enzimática

DESVENTAJAS

- Presencia de reacción inespecífica, especialmente cuando se utilizan anticuerpos policlonales,
- Algunos reactivos son potencialmente carcinógenos y su manipulación debe ser cuidadosa.
- Requiere estandarización precisa y estricto control de calidad.
- En necesario reanimar los antígenos tisulares.

VENTAJAS

- Permite una localización más precisa de las reacciones.
- Puede utilizarse tejido fijado e incluido en parafina.
- La tinción es permanente, estable, puede contrastarse y puede ser evaluada con microscopio de luz.
- El material así estudiado puede archivarse por años sin pérdida de la intensidad de la reacción.
- Los anticuerpos monoclonales han permitido aumentar la especificidad, sensibilidad y gama de esta técnica.

2.1.3 Las enzimas como Medio de Diagnóstico en el Laboratorio de Microbiología.

La microbiología médica puede resultar una disciplina desconcertante para quien comienza su estudio. Por tanto, los estudiantes así como los investigadores de diversos campos de esta ciencia deberán enfrentarse a un gran número de preguntas al estudiar microbiología.

¿Cómo aprender todos los nombres? ¿Qué agentes infecciosos provocan enfermedades? ¿Por qué? ¿Cuándo? ¿Qué individuos presentan un mayor riesgo? ¿Existe algún tratamiento? Sin embargo, todas estas dudas pueden reducirse a una pregunta esencial: ¿qué información necesito tener que me sea útil para entender cómo diagnosticar y tratar a un paciente que presenta una infección?

El campo de la bacteriología ha sufrido cambios significativos en cuanto a los métodos bioquímicos empleados para la clasificación y la nomenclatura bacteriana; para ello en los laboratorios biológicos permanecieron bastante constantes con el transcurrir de los años, donde las relaciones del ADN, análisis de secuencia de ARN, las reacciones específicas de antígeno anticuerpo y enzima sustratos, y otros métodos analíticos sofisticados, proporcionaron información más profunda sobre muchos microorganismos.

En este capítulo nos adelantamos los métodos y técnicas de pruebas para la identificación de microorganismos, en especial las bacterias, tales como; prueba de Basiprecinas y Sulfa metoxsasol-Trimetoprima(SXT) ;prueba de beta lactamasa, prueba de lecitinasa; prueba de lipasa; entre otras como describiremos a continuación.

➤ **Enzima beta hemolisina estafilocócica (beta-lisina)**

La enzima beta hemolisina estafilocócica también conocida como beta-lisina se utiliza en la prueba o reacción de CAMP para determinar la capacidad de los estreptococos de producir un agente líquido que se manifiesta como una zona hemolítica

Determinar las capacidades de un microorganismo para producir y elaborar el factor Camp, que actúa de manera sinérgica con la beta hemolisina estafilocócica (beta-lisina) sobre eritrocitos de las ovejas o bovinos para producir un fenómeno líquido, en la unión de los dos microorganismos. El fenómeno lítico se denomina prueba o reacción de Camp que proviene de los apellidos de sus autores originales, reacciones que más tarde se utilizaron para definir o determinar la capacidad de los estreptococos de producir un agente líquido que se manifiesta como una zona hemolítica con la beta-lisina estafilocócica.

Objetivos de la Prueba CAMP

La prueba CAMP se utiliza para diferenciar e identificar de manera presuntivas Cepas humanas o animales de estreptococcus agalactae del grupo (b+) de otras especies de estreptococcus negativo, cuando se incuban en aerobiosis o en condiciones reducidas. También es utilizada para verificar o identificar especies patógenas hemolíticas de listeria junto con la producción de ácido a partir de d-xilosa, L-raminosido y gama-metildmagnocito. La prueba de campo inversa se utiliza para distinguir de manera presungtida de Clostridium perfringes positivos de otra especies de clostridium, formadoras de esporas y productora de sulfito. Además de su utilidad como coadyuvante en la distinción de Acanobacterium haemoliticum (+) de Aerobacterum piogenes y Vernadiae (-).

Fundamento Bioquímico

La prueba o reacción CAMP se basa en el hecho de que los estreptococos del grupo B producen un factor que actúa de manera sinérgica con la beta hemolisina de ese Aureus Subpbes aureus en medio de agar con sangre ovina o bovina. El sinergismo es una acción coordinada o correlacionada por 2 o más microorganismos, el sinergista, factor CAMP, es un Adyuvante de la acción de otro microorganismo.

➤ Enzima Fosfolipasa D (PLD)

La enzima fosfolipasa D es una enzima cuya producción se utiliza para distinguir Corinebacterias pseudotuberculosis (+), y Corynebacterium ulserans (+) de otras especies de Corynebacterium (-); constituyendo ello un marcador distinto dentro de géneros.

➤ Enzimas Catalasa y Peroxidasa.

Las enzimas Catalasas y Peroxidasa se utilizan en la prueba de la catalasa y peroxidasa para diferenciar entre los géneros Estreptococcus(-) de Micrococcus(+) o de Staphilococcus(+) o de ambos a partir de probar la presencia de una de estas enzima o de ambas

Objetivo de la prueba

→La prueba de la catalasa es principalmente utilizada para diferenciar entre los géneros Estreptococcus(-) de Micrococcus(+) o de Staphilococcus(+) o de ambos; tanto como Bacillus (+) de Clostridium(v-); Listeria monocitogenes (+), especies

de Kurtia(+) y de otros microorganismos que pueden ser similares desde punto de vista morfológico; Kigella dinitrificans(-) de otras de neisserias (+) y Morraxella catarrhalis(+); Especies de Xenorhabdus(-) de otros miembros de la familia enterobacteriaceae

Por lo que, la Prueba de la catalasa y peroxidasa también se utiliza para diferenciar cepas cocidas de legionela p-neumophila(catalasa negativa, peroxidasa positiva) de otras especies de legionellas (catalasa+ y peroxidasa -), así como para diferenciar leptospira interrogans patógenas(catalasa fuertemente+, peroxidasa+, débil o negativa).

Reacción Bioquímica

Cuando las flavoproteínas reducidas o las proteínas con azufre y hierro reducidas se unen con el oxígeno y las oxidasas presentes en las cadenas respiratorias de todas las bacterias se forman dos compuestos tóxicos: el H_2O_2 y el radical superóxido (O_2^-). El peróxido de hidrógeno es un producto final oxidativo de la degradación aerobia de los azúcares. Las flavoproteínas reducidas reaccionan de manera directa con el oxígeno gaseoso por vía de la reducción de electrones para formar H_2O_2 , no por la acción directa entre el O_2 y H_2 molecular. Las catalasas, las peroxidasa y la superóxido dismutasa (SOD) eliminan en forma catalítica los intermediarios de la reducción del oxígeno. Ambas enzimas son esenciales en la defensa biológica contra las toxicidades del oxígeno.

Catalasa u Oxidasa

Flavoproteínas -----> Flavoproteína reducida

La catalasa y la POD están presentes en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromos; las excepciones principales son las especies de estreptococcus que carecen de catalasa. Los anaerobios obligados carecen de ambas enzimas; La mayoría de las bacterias aerobias poseen peroxidasa en el lugar de catalasa.

Ambas enzimas son consideradas hidropoxidasas. Las POD son enzimas vegetales, pero también se encuentran en la leche y en los leucocitos. Mientras que, las catalasas están presentes en los animales y vegetales. Por tanto, el centro activo de la catalasa es una proteína hemo denominada citocromo. El hemo de la catalasa es un complejo de hierro y porfirina de alto giro de Protoporfirina 9.

Interpretación

Prueba de catalasa rutinaria (portaobjeto o tubo)

Positivo: burbujeo inmediato, observado con facilidad, por formación de O₂.

Negativo: ausencia de burbujas, ausencia de oxígeno.

➤ Enzima Coagulasa

La enzima coagulasa se utiliza en la prueba de coagulasa para diferenciar especies del género *Staphylococcus* a partir de su capacidad de coagulación.

Principio: Probar la capacidad de un microorganismo de coagular el plasma por la acción de enzima coagulasa.

Objetivo:

- a) La prueba de coagulasa se utiliza de manera específica para diferenciar especies dentro del género *Staphylococcus*
- b) *Peptostreptococcus indolicus*(+) de otras especies de *Peptostreptococcus*(-) que puede causar infecciones en humanos
- c) Diferenciación de *Erysipelothrix*(+) de *Listeria*(-) y especies de *Cornebacterium* (-) .

Reacción Bioquímica

La estafilo-coagulasa, la enzima producida por *Staphylococcus aureus* es relativamente estable al calor y resiste temperaturas de hasta 60° C durante 30 minutos. Esta proteína es excretada al medio extracelular por las cepas humanas y se inactiva con facilidad por las enzimas proteolíticas. Se desconoce la estructura química de la estafilo-coagulasa sin embargo existen muchas hipótesis sobre el mecanismo de la acción de la coagulasa. Esta enzima actúa sobre algunos constituyentes del suero para producir un coágulo o trombo. La coagulasa aumenta la velocidad de coagulación del plasma lo que produce la formación de un coágulo de fibrina.

Procedimiento

Prueba en portaobjeto: rápida y relativamente específica para la determinación de coagulasa ligada con la mayoría de las cepas de *Streptococcus aureus*.

a) Procedimiento en portaobjeto:

→ **Positivo**- agregación marcada en los 5-20 segundos;

→ **Positivo tardío**- cualquiera agregación o granulación después de 20 segundos y hasta minutos

→ **Dudoso** cualquier granulación después de un minuto

→ **Negativo**- sin cambios, la suspensión permanece homogénea.

b) procedimiento en tubo:

Positivo- formación de coágulo o filamentos de fibrinas separados

Negativo- ausencia de formación del coágulo.

➤ Enzima Ureasa

La enzima ureasa se utiliza en la prueba de ureas para determinar la velocidad de un microorganismo de hidrolizar la urea, en dos moléculas de amoníaco, con la resultante alcalinidad.

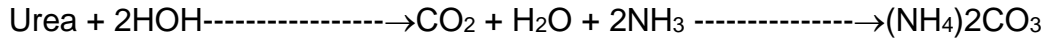
Objetivo de la prueba

Desde un principio esta actividad enzimática fue característica de todas las especies de proteus y se la utilizó sobre todo para diferenciar los microorganismos proteus rápidamente ureasa positivo de otros miembros de la familia enterobacteriaceae; los otros géneros pueden dar una reacción positiva tardía.

Reacción Bioquímica

El sustrato urea, una diamina del ácido carbónico a menudo se designa como una carbamina. Todas las amidas son hidrolizadas con facilidad. La urea es hidrolizada por una enzima específica, la ureasa, para dar dos moléculas de amoníaco. En solución la ureasa se hidroliza hasta carbonato de amonio como producto final.

ureasa



La ureasa es una importante enzima microbiana relacionada con la descomposición de los compuestos orgánicos, las enzimas bacterianas se clasifican como constitutivas o adaptativas. La adaptativa o inducida solo se produce solo cuando un sustrato específico está presente, pero la ureasa es considerada constitutiva debido a que es sintetizada por ciertas bacterias sin tomar en consideración la presencia o ausencia del sustrato, la urea.

Medios de cultivo empleados(Medios con difosfato de fenolftaleína-PDP)

→Sulfato de fenolftaleína (sal sódica de PDP-0,5g+agua decionizada-100ml)

→Caldo nutritivo PDP(extracto de carne-3g+ peptona-5g+1000ml)

→agar nutritivo PDP(extracto de carne-3g+peptona-5g+NaCl-8g+Agar-15g+agua-1000ml)

Interpretación de los resultados

a) Caldo con urea de Stuart:

Positivo: color rojo-rosado intenso en todo el caldo; ciertas especies de Proteeae

Negativo: sin cambios de color (amarillo – naranja-)

b) Agar con urea de Christensen:

Positivo: color rojo-rosado o rojo violeta intenso en el pico de flauta, el color puede penetrar en el interior de agar, cuya extensión indica la velocidad de la horolisis de la urea.

Negativo: sin cambio de color(color piel a amarillo pálido)

➤ Enzima Oxidasa

La enzima oxidasa se utiliza en la prueba de la oxidasa para identificar todas las especies de neiserias y para distinguir los miembros de la familia Pseudomonadaceae de los miembros de la familia Enterobacteriaceae

Principio de la prueba de oxidasa

Determinar la presencia de la enzima oxidasa.

Objetivos de la prueba oxidasa

Identificar todas las especies de neiserias fue utilizada con posterioridad para distinguir los miembros de la familia Pseudomonadaceae (pseudomona) de los miembros de la familia Enterobacteriaceae oxidasa negativa. La mayoría de las bacterias grampositiva son oxidasa negativas. Entre la familia de las enterobacteriaceae solo plesiomonas shigelloides es oxidasa positiva y además ayudar a la diferenciación entre los géneros.

Reacción Bioquímica

La prueba de la oxidasa esta se basa en la producción bacteriana de una enzima oxidasa intracelular y se debe a un sistema de citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido por el di oxígeno molecular que a su vez actúa como aceptor de electrones en la fase terminal del sistema de transferencia electrónica. Visto que todas bacterias aerobias obtienen su energía a partir de la respiración, proceso responsable por la oxidación de varios sustratos, pues teniendo en cuenta que la cadena respiratoria es una secuencia de enzimas y transportadores de equivalentes reductores desde el sustrato al oxígeno molecular que oxida un sustrato, ese oxígeno es aceptor final del hidrógeno produciéndose agua o peróxido de hidrógeno, lo cual depende de la especie bacteriana y de sus sistemas enzimáticos.

El sistema citocromo, por lo común se encuentra solo en microorganismos aerobios, permitiendo que estos utilicen el oxígeno como aceptor final del hidrógeno para reducir el oxígeno molecular a peróxido de hidrógeno.

Los anaerobios obligados carecen de la actividad de la oxidasa, no pueden vivir en presencia de oxígeno atmosférico y no poseen un sistema de citocromo oxidasa.

Interpretación de los resultados

- Colonias oxidasa positiva: color rosa, luego marrón (rojo-oscuro) y por ultimo negro purpuro en los 10 a 15 segundos. Pero cuando se utiliza una mezcla reactiva de dimetil-p-fenilandiamina- α -naftol, un resultado positivo se denota por un color azul en 1 a 2 minutos.
- Colonias oxidasa negativa: Sin cambios de color en las colonias o un color rosa pálido debido al reactivo. Pero puede ocurrir un cambio al negro en el medio circundante. También según el científico Steel, el desarrollo de color después de los 60 segundos se considera un resultado negativo.

➤ Enzima Fosfatasa

La enzima fosfatasa se utiliza en la prueba de la fosfatasa para determinar la patogenicidad de las especies de estaphilococcus, diferenciar especies de Actinobacillus, diferenciar los constituyentes predominantes de la flora oral de Mycoplasmas y diferenciar los miembros de la familia enterobacteriaceae(+) de otras bacterias intestinales gramnegativas.

Principio: Determinar la capacidad de un microorganismo de producir la suficiente enzima fosfatasa para hidrolizar el difosfato de fenolftaleína (PDP)

Objetivo

→**A partir de un medio con PDP**, en un comienzo sirve para determinar principalmente la cepas patógenas de las especies de estaphilococcus (aureus coagulasa+); Para diferenciar especies de Actinobacillus (muris,seminis,etc), Haemophilus+, Pasteurella testudinis, Kurthia (zopfii, gibsonii+, sibirica+), Corinebacterium + y -; Y para diferenciar los constituyentes predominantes de la flora oral de Mycoplasmas (salivarium+, orales-.

→**Y a partir de la prueba de fosfatasa con verde de metilo (MGP)** se diferencian los miembros de la familia enterobacteriaceae(+) de otras bacterias intestinales gramnegativas.

Reacción Bioquímicas

La producción de fosfatasa se determina por la liberación de fenolftaleína, indicada por un cambio de color en el medio. La fenolftaleína liberada reacciona con un álcali para dar un color rosa a rojo brillante. La ftaleína es un compuesto del anhídrido ftálico con un fenol o derivado fenólico que contiene un anillo lactona de cinco lados. El anhídrido ftálico combinado con dos moléculas de fenol forma el compuesto fenolftaleína.

fosfatasa

Difosfato de fenolftaleína(sal sódica) ----->Fenolftaleina libre

Fenolftaleina+alcali(NaOH o NH3) ----->color rojo-rosado brillante.

Cuando la feniltaleina es neutralizada, el alcalis se une al grupo C=O, se rompe el anillo de lactona y se forma un quinoide en uno de los anillo bencénicos.

Interpretación de los resultados

Positivo: caldo o colonias coloreados de rojo-rosado brillante.

Negativo: sin cambios de color, el caldo o las colonias permanecen claras.

Nota...Según Lewis, los métodos de tubo y placa presentan una sensibilidad igual para los Staphilococcus coagulasa (+). Sin embargo sus estudios mostraron que el método de placa no indica cepas patógenas pero es mejor que el de caldo para los estaphilococcus coagulasa(-). Por otro lado, el método de caldo mostro menor cantidad de cepas fosfatasa (+) y coagulasa(-). Por lo que el procedimiento en caldo puede ser usado para la comprobación de la fosfatasa y coagulasa.

Características Bioquímicas de familia Enterobacteriaceae

- Son catalasa +
- oxidasa –
- todos fermentan la glucosa con producción de ácido o ácido y gas (CO_2 , H_2)
- poseen fermentación ácido láctica (metil red +) o ácido fórmica (acetilmetil carbinol (vogues proskauer +)
- se pueden dividir desde el punto de vista clínico en dos grandes grupos- fermentadores de lactosa (grupo coliforme) y no fermentadores de lactosa (Salmonella, Shigella, Proteus).

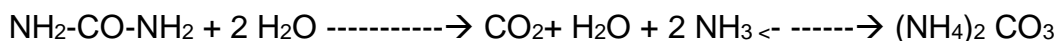
Para la identificación Bioquímicas de los miembros de la familia Enterobacteriaceae se recurre a las siguientes pruebas:

- Prueba del rojo de metilo

Sirve para determinar la presencia de fermentación ácido láctica en los miembros de la familia enterobacteriaceae, los cuales cuando la efectúan, producen gran cantidad de ácido láctico a partir de la glucosa (26 moles de ácido por mol de azúcar) y por tanto, viran el indicador rojo de metilo a color rojo (cuando el ph es menor que 5).

- Prueba de la ureasa

Permite determinar si una bacteria es capaz de degradar la urea (NH_2CONH_2) por acción de la enzima ureasa dando amoniaco y carbonato de amonio.



La aparición de coloración rojo-cereza indica la presencia de la enzima y se considera positiva por producción de carbonato de amonio que alcaliniza el medio.

resultado + en 1-6 h: posible proteus

resultado + en 24h o más : posible klebsiella, citrobacter o enterobacter

resultado - : no hay cambio de coloración

- **Producción de indol**

Determina la presencia de la enzima triptofanasa, la cual permite que los bacilos crecidos en medio como el agua de peptona en el cual se encuentra presente el triptofano, este sea oxidado a indol y ácido. por lo que, la porción pirrólica del indol reacciona con el paradimetil aminobenzaldehído (reactivo de kovacs) y produce indolina de color rojo.

triptofanasa

l- triptofano-----→indol + ácido pirúvico

Pirrol + p-dimetil-amino benzaldehído-----→compuesto quinoidal rojo indolina

2.1.4 Ejercicios de Comprobación del Capítulo 2.1

1. ¿Por qué para el diagnóstico de una pancreatitis además de observar los valores séricos de amilasa se debe tener en cuenta la excreción urinaria de la enzima?
2. ¿Por qué patologías como pancreatitis y embarazo ectópico están relacionadas con el aumento sérico de la enzima amilasa?
3. ¿Por qué para el diagnóstico de un infarto del miocardio o hepatitis se deben tener en cuenta los niveles séricos de las transaminasas TGO/ASAT y TGP/ ALAT?
4. El uso de los biocatalizadores en el laboratorio tiene gran importancia por las características de los mismos.

- a) De las enzimas que se muestran a continuación diga su localización y la patología con la cual se relaciona su aumento en sangre:
1. Creatina quinasa
 2. Láctico deshidrogenasa
 3. TGO
5. Seleccione V o F y subraye la palabra que determine su selección falsa.
- a) ___ La fosfatasa ácida se localiza en la próstata.
 - b) ___ La alanina aminotransferasa está presente en pequeñas cantidades en el hígado,
 - c) ___ Las isoenzimas de la deshidrogenasa láctica difieren en su movilidad electroforética.
 - d) ___ La transaminasa glutámica pirúvica está contenida principalmente en el citoplasma de las células del parénquima hepático.
 - e) ___ La aspartato aminotransferasa es un enzima unicelular tener su localización celular en las mitocondrias y en el citoplasma.
 - f) ___ La fuente de GGT presentes en suero es de los tejidos renales
6. Relacione las enzimas de la columna A con su comportamiento en la columna B.

Columna A

- 1-TGP.
- 2-TGO.
- 3-CPK.
- 4-Amilasa

Columna B

- a) ___ Su aumento sérico está relacionado con el embarazo ectópico y las úlceras peptídicas
- b) ___ Se encuentra en mayor concentración en el músculo esquelético.
- c) ___ Sus valores aumentan más significativamente en la Hepatitis Viral.
- d) ___ Mide la intensidad de la lesión hepática.
- e) ___ Se encuentra en mayor concentración en el tejido cardíaco.
- f) ___ Sus valores se incrementan significativamente en la pancreatitis.
- g) ___ Mide la extensión de la lesión hepática.
- h) ___ Su ubicación en el tejido hepático es a nivel mitocondrial.
- i) ___ Sus valores se encuentran aumentados en la prostatitis.

7. Seleccione con una X la prueba diagnóstica que se indica en cada una de las entidades clínicas:

a) Hepatitis viral aguda virus B

___ TGP

___ Antígeno de superficie.

___ Fosfatasa Alcalina.

b) Hepatitis con colestasis (marcador de colestasis)

___ TGO

___ Fosfatasa Acida

___ Fosfatasa Alcalina

8. Relacione las enzimas de la columna A con su característica en la columna B

Columna A	Columna B
1-LDH1	___Enzima pancreática
2-GGT	___Aumenta en alcohólicos y embarazadas
3- TGP/ALT	___Diagnóstico tardío del IMA
4-Amilasa	___Su mayor aumento es en el íctero obstructivo
5- SP	___Marcador prostático
6-AP	___Enzima hepática unilocular
7- TGO	___Enzima bilocular

___Abundante en cerebro

9. Los métodos citohistoquímicos se utilizan con el objetivo de localizar diversas moléculas en los cortes de tejidos.
- a) mencione al menos 5 moléculas demostrado por estos métodos.
 - b) ¿Cuál es la base en que se fundamentan tales métodos?
10. ¿Cuál es el fundamento de los métodos para la localización de enzimas en determinados tejidos?
- a) Mencione ejemplos de enzimas y sus respectivas localizaciones anatómicas donde su desequilibrio tiene una significación clínica que se logran localizar por estos métodos.
11. De los métodos utilizados en citohistoquímica, describa la técnica más utilizada argumentando sobre su importancia y principio.
12. ¿Cuál es la diferencia fundamental entre las técnicas de histoquímica enzimática de las inmunohistoquímica también enzimática?
13. ¿Con que objetivo se le realiza la prueba de coagulasa en el laboratorio de Microbiología?
14. Mencione los dos procedimientos imprescindibles que anteceden a la prueba de coagulasa.
15. ¿Cuáles deben ser los resultados o características presentadas en los dos procedimientos de la respuesta anterior que conducen a la realización de la prueba de la coagulasa?
16. La prueba de catalasa es un ensayo de diferenciación bacteriano. a) Argumente la afirmación anterior
17. ¿En que circunstancias laboral considera usted que sea necesario la utilización de la prueba de ureasa? Argumente su respuesta?
18. La oxidasa nos permite diferenciar un gran número de especies bacteriológicas,
- a) Mencione los microorganismos de interés médico que son diferenciables por este examen.

2.2 Las Enzimas como Herramientas de trabajo o reactivos químicos.

Enzimas preparadas industrialmente presentes en reactivos exógenos utilizadas para la detección y cuantificación en muestras biológicas de metabolitos como la glucosa, la urea, el ácido úrico, el colesterol y TAG entre otros, resultantes de alteraciones metabólicas o fisiológicas.

2.2.1. Enzimas como Herramientas de trabajo o reactivos químicos en el Laboratorio Clínico.

En el laboratorio clínico se trabaja diariamente con reacciones donde intervienen las enzimas como herramientas para evidenciar y cuantificar otras sustancias como la glucosa, urea, ácido úrico, colesterol y muchos más. Esas enzimas son preparadas industrialmente con especificidad de reaccionar con el sustrato contenido en la muestra en estudio.

➤ Enzima Glucosa-Oxidasa.

Generalidades

La glucosa-oxidasa es una enzima que se encuentra en el reactivo del método Rapiglucó-Test que se usa para cuantificar la glucosa presente en el suero. La glucosa es un el carbohidrato o glúcido más importante presente en la sangre, constituyendo su oxidación la principal fuente de energía para las células animal por lo que su administración en la diete bajo la forma de polisacárido y almidón es fundamentalmente.

Son muchas las hormonas que intervienen en el metabolismo glucídico: La insulina, como hormona hipoglicemiante, promueve la utilización de la glucosa, facilitando su paso al interior de la célula mediante la fosforilación y su almacenamiento en forma de glucógeno en hígado y músculo; glucagón y la adrenalina como hormonas hiperglicemiantes promueven la glucogenólisis hepática y muscular respectivamente; los corticoides y ACTH favorecen la glucogénesis y la somatropina inhibe la fosforilación de la glucosa. Todas estas hormonas mantienen la concentración de glucosa entre los límites precisos.

Indicaciones

La determinación de glucosa a partir de la utilización de la glucosa-oxidasa se usa en el diagnóstico y control de la enfermedad del metabolismo de los carbohidratos, como diabetes mellitus en sus diferentes formas, hipoglicemias neonatales, etc. Pero la patología más común relacionada con el metabolismo de los hidratos de carbono es la diabetes mellitas. El diagnóstico precoz y el control de los pacientes diabéticos, tienen por objeto evitar la cetoacidosis y las complicaciones de los síntomas resultantes de la hiperglicemia, mediante el tratamiento adecuado. La diabetes puede ser primaria o secundaria en relación con enfermedades del páncreas; endógenas, hormonales; puede ser insulino resistente por reducida tolerancia a los carbohidratos o glúcidos. Modificaciones de la glucosa se pueden

encontrar en la pancreatitis, la disfunción de la tiroides, en el traumatismo craneal, en accidente cerebro vascular y en el infarto del miocardio. Puede existir exceso de consumo de glucosas en el trabajo muscular, como en la hiperpirexia y en la tirotoxicosis.

Muestreo

En el suero

Modalidad de solicitud

La solicitud puede ser de carácter rutinaria en ayuna de 6 a 8 horas y en algunos casos se prescribe una alimentación particular antes de la toma de la muestra, con previo preparación del paciente en el sentido de evitar el estrés, ya que puede comportarse como una falsa hiperglicemia por una descarga de adrenalina muscular en los días antes de la toma de la muestra, verificar la idoneidad del muestreo en lo que es la identificación, hemólisis, lipemia, presencia de coágulos, filamentos de fibrina, turbidez. Señalar eventualmente en el resultado la no idoneidad de la muestra; transportar a temperatura ambiente; Centrifugar a 3000 r.p.m por 5 mnts y separar del suero; Ejecutar el examen cuantos antes, visto que la glucosa es influenciada por la temperatura de conservación, desde la contaminación de bacterias y en particular la glucolisis. La toma de muestra se puede conservar por 8 horas a temperatura ambiente de 20-25°C y por 3 días a 2 o 4°C.

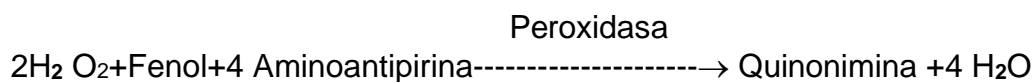
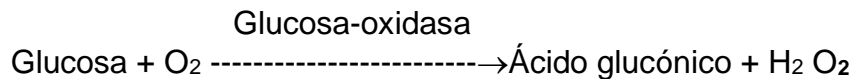
Métodos de determinación

Rapiglucos-test (Método enzimático GOD-POD)

Se emplea los reactivos- Glucosa/GOD-POD y Glucosa 5,55 mmol/L de solución de referencia., una vez abierto es estable por 2 meses en 2 a 8 °C. Es específica para la determinación de glucosa en suero por método enzimático de punto final. "PARA USO INVITRO". Lineal a un rango de la actividad enzimática 2,0 a 22,0 mmol/L a una densidad óptica del blanco reactivo a 500 nm(492-550) y sensible a 2,0mg/dl.

Principio del método

Determinación de Glucosa en suero, a través de la formación de una quinonimina que se determina espectrofotométricamente a 500 nm, según el siguiente esquema de reacciones:



Pues, la glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de la glucosa a ácido Glucónico o peróxido de hidrógeno el cual se valora mediante la reacción de Trinder dando lugar a una quinoneimina coloreada en cuya intensidad es proporcional a la cantidad de Glucosa presente en la muestra.

$$C_m = A_m \times Cr/Ar$$

Técnica

Mezclar 20 microlitros de muestra con 2ml de Rapigluco-test e incubar a 37 °C durante 5 minutos. Leer los valores de absorbencia de la muestra y la referencia contra blanco a 500 nm (492 a 550). El color desarrollado es estable 60 minutos. También se puede seguir las instrucciones de la casa comercial. Y los resultados se escriben sin cifras decimales.

Verificar el resultado:

- Si el valor de la glucosa es < 50.0 mg/dl y ≥350. mg/dl, repetir la medida.
- Si el valor del resultado repetido es el mismo, se puede entregar.
- Si el valor del resultado repetido es diferente, procesar nuevamente la muestra utilizando un control patológico.
- Con valores de glucosa ≥ de 450.0 mg/dl, repetir la medida, sea concentrada y diluida 1/2 con solución fisiológica y con un control patológico.
- Si la confrontación del valor sobrepuesto al suero diluido y el control está dentro el rango establecido, se puede entregar el resultado.
- Si el suero diluido no está en relación con el suero concentrado, diluir la muestra 1/3 con solución fisiológica, siempre usando el control patológico.

Interferencias

Las más significativas son: Hemólisis: con Hb ≥8.0 g/l; Ictericia: con bilirrubina ≥36.0 mg/dl; Lipemia: con triglicéridos ≥430.0 mg/dl; algunas hormonas, el ácido ascórbico, todas las sustancias reductoras pueden dar valor bajo de glucosa. La hormona adrenalina, algunas drogas y los derivados de las anfetaminas pueden dar valor alto de glucosa.

Valor de referencia: 4, 20 a 6, 11 mmolo/L

Criterios de validación

- Controlar primeramente el examen de orina para eventual presencia de glucosa y/o cuerpos cetónicos; parámetros del metabolismo glucósido (hemoglobina glicosilada, insulinemia); eventuales parámetros de funcionalidad tiroidea y suprarrenal; parámetros del metabolismo lipídico y el valor del ácido úrico; electrolitos (sodio, potasio, cloro, magnesio) y confrontar con analitos de funcionalidad hepática.

Comunicación de riesgo

Se tiene que comunicar inmediatamente con valores inferiores a 50.0 mg/dl y superiores a 500.0 mg/dl.

Control de Calidad

Se deberán usar sueros, control normal y patológico, en las mismas condiciones que las muestras.

PRUEBA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA ORAL DE 2h (PTG-O 2h)

Fundamento

En pacientes sanos, la respuesta de la insulina para eliminar del flujo sanguíneo una sobrecarga de glucosa administrada por vía oral es inmediata, con un pico a los 30 - 60 minutos, retornando a la normalidad a las dos horas.

Indicaciones

Antes de la prueba

- Los 3 días precedentes se debe aplicar una dieta que contenga por lo menos 150 g/ día de carbohidratos.
- La falta de apetito o la inactividad (reposo en cama u hospitalización) invalidan la prueba.
- Guardar ayuno de 12 horas o no más de 16 horas, suprimiendo incluso el café. Sólo agua.
- Prohibido fumar o realizar ejercicios, incluso ligeros.
- No debe aplicarse la prueba a personas enfermas en las dos semanas precedentes.
- Se deben tener controladas algunas enfermedades endocrinas que alteran la prueba, Ej. acromegalia, síndrome de Cushing, hipertiroidismo, feocromocitoma.
- Evitar fármacos como diuréticos, salicilatos, hipoglicemiantes y anticonvulcivantes por lo menos 3 días antes.
- Suprimir los anticonceptivos durante todo un ciclo.

Durante la prueba:

- Se debe permanecer en absoluto reposo, sin ingerir alimentos, ni fumar después de la primera extracción hasta la próxima.
- Pueden ocurrir mareos o náuseas durante la prueba.

Después de la prueba:

- Puede comer o tomar normalmente.
- Se debe administrar hipoglicemiantes a las personas que lo necesiten tan pronto termine la prueba.

Procedimiento

- Entre las 7-8 horas de la mañana, después de un ayuno de 12 h y luego de 30 min de reposo, se obtiene muestra venosa (1 ml de sangre + 1 gota [20 µl] de EDTA o fluoruro) para determinar glucosa plasmática por el método GOD PAD.

- 5 minutos después se ingiere una sobrecarga de 75 gr. de dextrosa (150 ml de solución de dextrosa al 50 %) para los adultos.
- Para los niños: 1.75 g/Kg de peso hasta 75 g (peso en kilogramos del niño por 3.5 [1.75 por 100/50]; el resultado sería el volumen en ml de dextrosa al 50 % a ingerir por el niño
- 100 g para la PTG de 6 horas (200 ml de dextrosa al 50 %).
- La próxima extracción se realizará según las indicaciones del médico (a las 2 h ó cada 1 h).
- En caso de existir náuseas, mareos, sudoración u otra manifestación de hiperactividad del sistema nervioso vegetativo, debe extraerse una muestra sanguínea inmediatamente o suspender la prueba.
- Si el paciente vomita la solución de glucosa el test queda invalidado y se debe repetir 3 días después.
- Si la primera determinación es superior a 11 mmol/l el test debe suspenderse o de lo contrario debe ser monitoreado por las posibles reacciones severas o el coma.
- A los pacientes con glucosa en ayunas por encima de 11.1 mmol/l no debe realizársele esta prueba.

Indicaciones del test

Historia familiar de diabetes; Obesidad; Episodios inexplicables de hipoglicemia; Historia de infecciones frecuentes; Mujeres con historia de macrofetos, muerte neonatal, parto prematuro y abortos; Glicosurias o hiperglicemias transitorias en embarazadas, cirugías, traumas, estrés e infarto agudo del miocardio; Glicemia en ayuno dudosa (< 11.1 mmol/l).

➤ Enzima Lipoproteína-lipasa(LPL)

Generalidades

La lipoproteína- lipasa es una enzima que se encuentra en el reactivo del método Monotriglittest que se usa para cuantificar los triglicéridos en suero o plasma. Los triglicéridos son ésteres de ácidos grasos cuya hidrólisis produce glicerol y ácidos grasos libres. Estos están compuestos de un alcohol trivalente (glicerol) y de tres cadenas largas de ácidos grasos. Son absorbidos, una parte, con la alimentación y, la otra parte, es sintetizada desde el hígado. Los triglicéridos alimenticios son transportados por los quilomicrones, mientras el transporte de la cantidad endógena a los tejidos se hace con las VLDL. Los triglicéridos son utilizados en los tejidos con la intervención de la lipasa lipoproteica. El 95.0% del tejido adiposo está constituido por triglicéridos. Si su determinación se realiza en conjunto con otros ensayos para lípidos; entonces resulta útil en el diagnóstico de hiperlipoproteinemia.

Indicaciones

La determinación de los triglicéridos se emplea en los distintos metabolismos: alteraciones del metabolismo lipídico, diabetes mellitus, síndrome nefrótico y muchas enfermedades endógenas, por lo que se puede afirmar que los niveles

anormales de Triglicéridos circulantes, están asociados a numerosas patologías, tales como enfermedades hepáticas, renales, hiperlipidemias esenciales, están relacionados también con la patogénesis de la arteriosclerosis coronaria. Visto que se puede encontrar hipertrigliceridemia por falta de lipasa proteica, exógena (introducción excesiva de alcohol, glúcidos y lípidos), endógena (congénita).

Muestreo

Suero o plasma- Los TG son estables en suero 3 días a 2-8 °C)

Modalidad de solicitud

La solicitud puede ser de carácter rutinaria en ayuna de 6 a 8 horas, con previa preparación del paciente en el sentido de no consumir alcohol en las últimas 72 horas antes de la toma de la muestra, verificar la idoneidad del muestreo en lo que es la identificación, presencia de coágulos, filamentos de fibrina, turbidez. Señalar eventualmente en el resultado la no idoneidad de la muestra; transportar a temperatura ambiente; Centrifugar a 3000 r.p.m por 5 mnts; La toma de muestra se puede conservar por 1 día a temperatura ambiente de 20-25⁰C , 5 días a 4°C y 3 meses en congelación.

Método (monotriglitést- enzimático de punto final)

Se emplea los reactivos-Triglicérido/LPL/GPO y Glicerol2,28mmol/L Para la determinación de Triglicéridos en suero por método enzimático por espectrofotometría a 500 nm. "PARA USO INVITRO". Lineal en un rango de la concentración de triglicéridos de 0,4 a 9,12 mmol/L. y específica para la determinación de triglicéridos. Los reactivos una vez abiertos son estables durante 1 mes conservados de 2 a 8 °C.

Metódicas de determinación

1-Método enzimático UV

Los triglicéridos son hidrolizados a glicerol y ácidos grasos por medio de una lipasa. El glicerol, por acción de la glicerol Kinasa (GK), es fosforilado en presencia de ATP. El ADP producido es reconvertido en ATP a través de la piruvatokinas (pk), y el piruvato formado es reducido a lactato en presencia del NADH, el cual se oxida a NAD. La cantidad del NADH oxidado se mide en absorbancia a 340 nm.

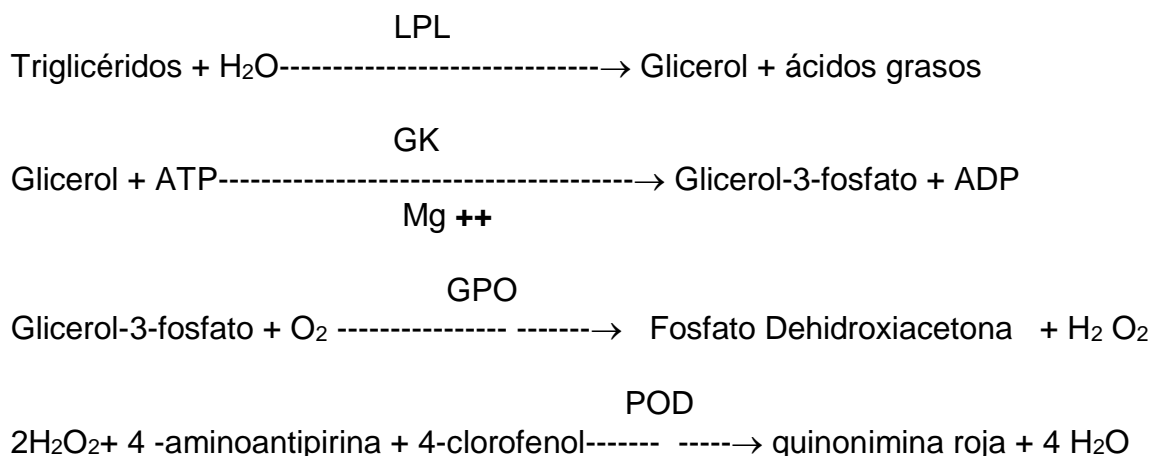
2-Método enzimático colorimétrico de punto final.

Los triglicéridos son hidrolizados a glicerol y ácidos grasos por medio de una lipasa. El glicerol por acción de la glicerol kinasa (GK) es fosforilado en presencia de ATP. El glicerol fosforilado es oxidado con producción de H₂O₂. Este, en presencia de la peroxidasa (POD), forma con la antipirina un complejo coloreado estable, el color del cual es proporcional a la concentración de los triglicéridos.

3-Método enzimático colorimétrico y procedimiento analítico

Los triglicéridos son hidrolizados a glicerol y ácidos grasos por medio de una esterasa. El glicerol es fosforilado por medio de la glicerol kinasa (GK) y,

posteriormente, oxidado por la glicerol fosfato oxidasa (GPO), produciendo peróxido de hidrógeno. El peróxido reacciona con un compuesto fenolado y la 4-aminofenazona, en presencia de peroxidasa (POD), para producir un complejo coloreado cuya intensidad de color es proporcional a la concentración de triglicéridos en la muestra.



LPL = Lipoproteína-lipasa
 GK = Glicerol-cinasa
 GPO = Glicerol-3-fosfato-oxidasa
 POD = Peroxidasa

Procedimiento:

Seguir las instrucciones de la casa comercial, como por ejemplo:
 Mezclar 20 microlitros de la muestra con 2ml del reactivo e incubar a 37 °C durante 10 min. Leer los valores de absorbancia de la muestra y la referencia contra el blanco a 500 nm. El color desarrollado es estable 30 min. Y los resultados se escriben sin cifra decimal.

Valores de referencia

Hombres: de 0,68 a 1,88 mmol/L
 Mujeres: de 0,46 a 1,60 mmol/L

Interferencias

Concentraciones de bilirrubina de 150,5 µmol/L o más y de 0,28 mmol/L de ácido ascórbico o más, disminuyen la concentración de triglicéridos en el suero humano. Concentraciones de colesterol superiores a 6,5 mmol/L en sueros normales y 11,1 mmol/L en sueros patológicos, concentraciones de hemoglobina superiores a 5 g/L sobrestiman los valores normales de Triglicéridos.

Criterios de validación de los resultados

Observar el aspecto del suero (aspecto lipémico, cuando los triglicéridos están mayor de 400.0 mg/dl); Controlar los parámetros del metabolismo lipídico

(colesterol, HDL, LDL, apolipoproteína); los parámetros del metabolismo glucídico; los parámetros de la funcionalidad del riñón (urea, potasio, proteínas, densidad urinaria); la funcionalidad hepática (particularmente la GGT, por toxicidad alcohólica); la funcionalidad tiroidea (en el hipotiroidismo > triglicéridos y colesterol).

Control de calidad

Todos los sueros control con valores de triglicéridos determinados por este método pueden ser empleados.

Semiología

Aumento en hiperlipoproteinemias tipos: I, IIB, III, IV, V; enfermedad hepática, síndrome nefrótico, hipotiroidismo, diabetes incontrolada, pancreatitis, enfermedad por almacenamiento de glucógeno, endocrinopatías, IMA, disfunción pancreática, toxemia, hipotiroidismo.

Disminución en enfermedad pulmonar obstructiva crónica, infarto cerebral, hipertiroidismo, malnutrición, síndrome de malabsorción.

➤ **Enzima Colesterol Esterasa.**

Generalidades

La colesterol esterasa es una enzima que se encuentra en el reactivo del método Colestet que se utiliza para la cuantificación del colesterol presente en suero o plasma. El colesterol es un compuesto liposo que se encuentra en sangre y en tejido biliar y cerebral; actuando como precursor de los ácidos biliares, los esteroides y la vitamina D. Es un esteroide sintetizado en muchos tejidos, especialmente en el hígado, la corteza supra-renal, en la pared intestinal, en las gónadas y la aorta.

Aproximadamente $\frac{1}{4}$ de colesterol se obtiene mediante la alimentación y $\frac{3}{4}$ por síntesis endógena. Un aumento en la dieta de colesterol disminuye la cuota endógena. La cuota de colesterol intestinal está controlada por la concentración en el intestino de las sales biliares. El colesterol, en relación con la alimentación, es esterificado desde las células intestinales. La cuota endógena es esterificada desde el hígado. Cuya determinación en suero es la principal prueba para diagnosticar y clasificar lipemias. El significado del colesterol en cada una de sus fracciones es diferente:

VLDL: incierto (utilización directa con los tejidos periféricos).

LDL(colesterol malo): transporta colesterol del hígado a los tejidos.

HDL(colesterol bueno): transporta colesterol de los tejidos al hígado.

Indicaciones

La determinación del colesterol se hace en la patología del metabolismo lipídico y lipoproteico. El colesterol circula en parte libre y en parte esterificado con ácidos grasos. La esterificación se cumple en el hígado.

-El aumento del colesterol se encuentra en algunas enfermedades hereditarias y en la alimentación no adecuada, en el hipotiroidismo, en el síndrome nefrótico, en

la enfermedad de Cushing, en la diabetes mellitus, en la pancreatitis, en la glucogenosis tipo I, III, VI, y también en las glomerulonefritis. Por lo que la colesterolemia elevada está asociada con mayor incidencia a las enfermedades cardíacas coronarias; así como que el colesterol es uno de los factores contribuyentes a la formación de ateromas dado que las complicaciones arterioescleróticas producen en individuos hipercolesterolémicos, por consiguiente, resulta de una gran importancia la determinación de los niveles séricos de colesterol en la clínica.

-La disminución del colesterol se encuentra en el déficit de alfa lipoproteína, en la insuficiencia hepática, hipertiroidismo, caquexia, mala nutrición, uremia, septicemia, enfermedad de Addison.

Muestreo

Suero o plasma- Los TG son estables en suero 3 días a 2-8 °C

Modalidad de solicitud

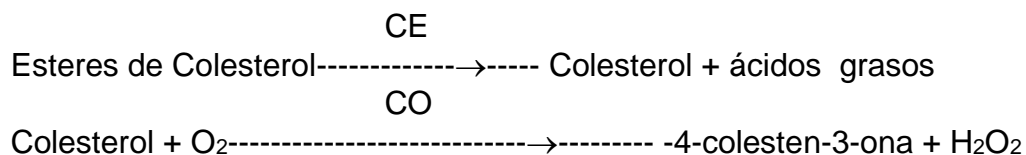
La solicitud es solo de carácter rutinaria en ayuna de 6 a 8 horas, con previa preparación del paciente en el sentido de no consumir alcohol en las últimas 72 horas antes de la toma de la muestra, evitar éxtasis venosa porque provoca hemoconcentración y la liberación de colesterol tisular y, por consiguiente, un aumento de colesterol hemático, verificar la idoneidad del muestreo en lo que es la identificación, presencia de coágulos, filamentos de fibrina, turbidez. Señalar eventualmente en el resultado la no idoneidad de la muestra; transportar a temperatura ambiente; centrifugar a 3000 r.p.m por 5 mnts; La toma de muestra se puede conservar por 1 día a temperatura ambiente de 20-25⁰C , 5 a 7 días a 4°C y 2 meses a -20° C .

Método

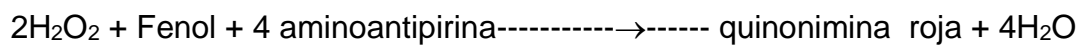
Enzimático colorimétrico (CHOD - PAP)

Fundamento

La colesterol esterasa hidroliza los esterres de colesterol presentes en la muestra dando colesterol libre que por acción de la colesterol oxidasa (CHOD) se transforma en H₂O₂ o colestén-3-ona. En la reacción catalizada por la peroxidasa (PAP) se obtiene un compuesto coloreado llamado quinoneimina. Pues el Colesterol presente en la muestra, según las reacciones que se describen a continuación, formándose un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría.



POD



CE: Colesterol esterasa

CO: Colesterol oxidasa

POD: Peroxidasa

Técnica

Mezclar 0,02ml de la muestra con 2ml del reactivo de trabajo e incubar a 37°C, durante 5 min. Leer los valores de absorbancia de la muestra y la referencia contra el blanco a 500 nm (492 a 550). El color desarrollado es estable 60 min.

Valores de referencia: 3,87 a 6,71 mmol/L

Interferencias

No hay interferencia de triglicéridos hasta una concentración de 5,7 mmol/L, glucosa 55 mmol/L, ácido ascórbico hasta 0,28 mmol/L y hemoglobina hasta 5 g/L.

➤ Enzima Ureasa

Generalidades

La ureasa es una enzima que se encuentra en el reactivo del método SalicUrea que se utiliza para la cuantificación de la urea presente en suero y orina. Las sustancias nitrogenadas de la sangre se dividen en dos fracciones: nitrógeno proteico y nitrógeno no proteico. El nitrógeno no proteico comprende diferentes sustancias: urea, aminoácidos, ácido úrico, creatinina, amonio, polipéptidos, purinas, nucleótidos, fenol e indol. La Urea constituye la fracción de nitrógeno no proteico más importante en la mayoría de los líquidos biológicos, en el hombre es el principal producto final del metabolismo de las proteínas, y constituye alrededor del 50% de los solutos contenidos en la orina. La concentración de urea en sangre oscila entre 1.7 – 6.7 mmol/l y sólo aumenta de modo significativo cuando se ha perdido más del 50% de la función renal. La concentración de urea en sangre es, sin embargo, una medida bastante imperfecta de la función renal. Depende entre otros factores, del aporte de proteínas en la dieta, del catabolismo proteico y del volumen de la diuresis.

La urea es producida desde el hígado, después de la desaminación oxidativa de los aminoácidos que representa una fuente de amoniaco para la ureogénesis o ciclo de la urea. En condiciones normales, la intensidad del catabolismo se adapta a la contribución exógena y, por tanto, la cantidad de nitrógeno excretada es la misma a la de origen catabólico, la cual corresponde a la cantidad exógena. Por lo que la urea contenida en el plasma es filtrada desde los glomérulos del riñón, y es reabsorbida por los túbulos en el 40.0%. El grado de absorción varía con la cantidad de agua reabsorbida. Es muy soluble, el 90.0% se excreta a través de la vía urinaria, y el restante 10.0% por vía extrarrenal (sudor, heces).

Indicaciones

La determinación de la urea representa el diagnóstico más común para la valoración de la funcionalidad renal. En el diagnóstico diferencial se emplea (con la determinación de la creatinina) en:

- Hiperuremia prerrenal: deshidratación (disminuida absorción o excesiva pérdida de agua), insuficiencia cardíaca, excesivo catabolismo proteico.
- Hiperuremia renal: alteraciones de la filtración glomerular y/o de la absorción tubular (glomérulo nefritis, riñón policístico, necrosis tubular, nefrosclerosis), alteración del flujo sanguíneo renal por enfermedad intrínseca del riñón.
- Hiperuremia post-renal: obstrucción de las vías urinarias (cálculos, hipertrofia prostática, neoplasia). Por lo que, una elevación de la concentración sérica de urea, se interpreta generalmente como una posible difusión renal. Sin embargo, no debe dejarse de lado el hecho de que los valores séricos de una urea se encuentran íntimamente relacionados con la dieta y el metabolismo proteico, por lo que cualquier alteración en estas variables se traducirá en un cambio de la concentración de urea en suero.

La determinación de Urea en Suero está estrechamente vinculada con las especialidades de Nefrología, Urología, Endocrinología, Cardiología y Nutrición. Con este producto es posible realizar estudio de diagnóstico o pronóstico de una enfermedad o condición clínica específica.

Muestreo

Suero y orina, la Urea es estable en suero 3 días a 2-8 °C

Modalidad de solicitud

La solicitud puede ser de carácter rutinaria (ayuna) o emergente, verificar la idoneidad del muestreo en lo que es la identificación, presencia de coágulos, lipemia, hemolisis, filamentos de fibrina, turbidez. Señalar eventualmente en el resultado la no idoneidad de la muestra; transportar a temperatura ambiente; Centrifugar a 3000 r.p.m por 5 mnts; La toma de muestra se puede conservar por 1 día a temperatura ambiente de 20-25°C, 7 días a 4°C y 1 año en congelación.

Metódicas de determinación:

1-Método de diacetilmonosina

La urea reacciona a temperaturas altas en presencia de ácido fosfórico con la diacetilmonosina, con formación de un producto coloreado en amarillo. La reacción es catalizada por iones férricos.

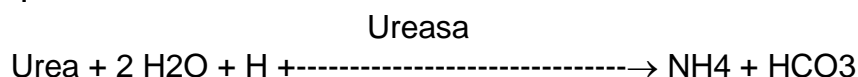
2- Método enzimático cinético. Urea- UV (Salic-Urea)

Se emplean 3 tipos de reactivos [R 1: Urea/Ureasa (3 frascos por 40 mL); R 2: Urea/NADH (1 frasco por 32 mL) R 3: Urea 8,33 mmol/L Sol. de referencia (1 frasco por 5 mL)]. El reactivo es lineal en un rango de concentraciones de Urea de 1,7 a 50 mmol/L; Límite de detección: 0,915 mmol/L; Límite de cuantificación:

1,665 mol/L; Densidad óptica del blanco reactivo a 340 nm: De 1,700 a 1, 900 a tiempo cero. En el que pueden interferir las Concentraciones de hemoglobina superiores a 5 g/L, triglicéridos mayores de 11,4 mmol/L, de Glucosa mayores de 8 mmol/L y de Acido ascórbico mayores de 1,13 mmol/L sobrestiman la concentración de Urea en suero y plasma normales y patológicos. Con fines de la determinación de Urea en suero y plasma por método cinético ultravioleta. "PARA USO IN VITRO"

Principio del método

Reacción enzimática de la Urea presente en la muestra, según las reacciones que se describen a continuación, formándose un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría, visto que, en medio alcalino y en presencia de salicilato e hipoclorito de sodio, los iones de amonio reaccionan produciendo un compuesto de color verde cuya absorbancia se mide a 580-620 nm según la casa comercial.



Donde:

GLDH: Glutamato deshidrogenasa

NADH: Nicotina adenina dinucleótido, forma reducida

NAD+: Nicotina adenina dinucleótido, forma oxidada.

Técnica:

Mezclar 4 volúmenes del Reactivo1 con 1 volumen del Reactivo 2 y juntar o reaccionar 10microlitros de la muestra (suero o plasma) con 1ml de solución de trabajo. Las lecturas son efectuadas a 340 nm a una temperatura de 37 °C. Se realiza una primera lectura (t1) a los 30 s y una segunda lectura (t2) a los 90 s contra agua purificada a la misma longitud de onda.

Cálculo de la concentración de la urea.

$$\text{Conc} = \frac{t_2 - t_1 \text{ muestra}}{t_2 - t_1 \text{ referencia}} \times 8,325 \text{ mmol/L}$$

Valores de referencia: De 3,3 a 8,3 mmol/L

Se asigna el valor a la solución de referencia de Urea 8,33 mmol/L utilizando multicalibradores: ELICAL 2 (firma SEPPIM , No. Cat. CALI-1550), calibrador para sistema automatizado (Cfas, Firma Roche No. Cat. 759350) y TruCal U (Firma DiaSys No. Cat. 591009910063).

Ensayo funcional

Se utilizan sueros control de concentración conocida de Urea en un rango de valores normales y patológicos del analito: Elitrol I No. Cat. 0060 y Elitrol II No. Cat. 0160 (Firma SEPPIM), Precinorm U No. Cat. 188 027 y Precipath U No. Cat. 188 006 (Firma Roche), Trulab N No .Cat. 590009910061 y Trulab P No. Cat. 590509910061 (Firma DiaSys)

3-Método de Berthelot (Salic-Urea)

Se emplea 4 tipos de reactivos-Urea 8,33mmol/L-sol. Referencia; Urea liofilizada-1 tubo; reactivo color y reactivo alcalino, para la determinación de Urea en suero por método enzimático colorimétrico a 620 nm. "PARA USO INVITRO". Lineal en un rango de la concentración de Urea de 1,5 a 26,0 mmol/L. y específica para la determinación dicha sustancia, por lo que al preparar el reactivo de trabajo no debe agitarse pues podría causar la desnaturalización de la enzima. . Los reactivos una vez abiertos son estables durante 4 semanas conservados de 2 a 8 °C y una semana a 15-25° c.

Materiales Adicionales

Reactivo 1: Fenol; R2: Hipoclorito de sodio; **R3: Ureasa 100 U**; R 4: Fosfato y EDTA; Espectrofotómetro

Preparación de reactivos de referencia de la urea.

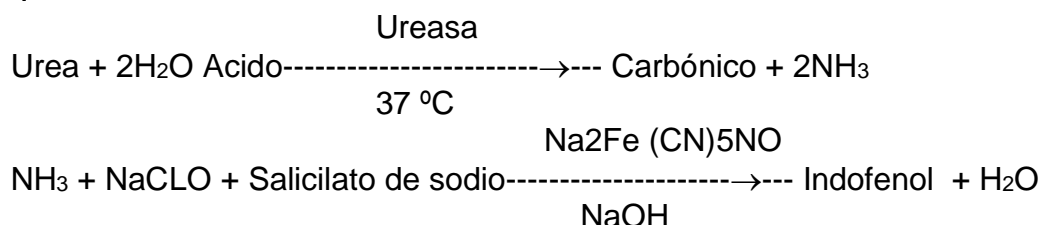
- *Reactivo 1:* Trasvasar cuantitativamente el contenido del reactivo 1 a un frasco volumétrico de 500 mL, diluir con agua purificada, enrasar y homogeneizar. La concentración del reactivo después de reconstituido es de 0,11 mol/L. Estable durante 6 meses en frasco ámbar a una temperatura de 2 a 8 °C Las soluciones de referencia están listas para usarlas.
- *Reactivo 2:* Trasvasar cuantitativamente el contenido del reactivo 2 a un frasco volumétrico de 500 mL, diluir con agua purificada, enrasar y homogeneizar. La concentración del reactivo después de restituido es de 11 mol/L. Estable durante 6 meses en frasco plástico a una temperatura de 2 a 8°C.
- *Reactivo 3:* Tomar una frasco del reactivo 3, reconstituir con 20 mL del reactivo 4. Estable durante 6 días como mínimo a temperatura de 2 a 8 °C.
- *Reactivo 4:* Listo para usar

Nota: Dejar que los reactivos alcancen la temperatura de 25 a 30 °C y homogeneizar perfectamente antes de

Principio del método

Reacción enzimática de la Urea presente en la muestra, según las reacciones que se describen a continuación, formándose un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría, visto que, en medio alcalino y en presencia de salicilato e hipoclorito de sodio, los iones de amonio reaccionan produciendo un compuesto de color verde cuya absorbancia se mide a 580-620 nm según la casa comercial.

Es decir que el método de Berthelot es una reacción enzimática de la Urea presente en la muestra en la que se forma un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría, en el que para preparar la curva de calibración, realice el ensayo de referencia con cada una de las seis soluciones de Urea por triplicado.



Sin embargo, la enzima ureasa reacciona sobre la urea, transformándola en iones de amonio. Después, el amonio se hace reaccionar en medio alcalino con fenol y hipoclorito, formándose azul de indofenol, cuya intensidad de color es proporcional a la concentración de urea.

Técnica

Mezclar 0,02ml de muestra con 2ml del reactivo de trabajo e incubar a 37 °C durante 5 min. Leer los valores de absorbancia de la muestra y la referencia contra blanco a 620 nm. Color desarrollado es estable durante 1h.

Orina: Diluir la orina, 0.1 ml (100 µl) de muestra con 5 ml de agua destilada (dilución 1:50), multiplicar el resultado por 10 y multiplicar por el volumen de orina en litros. Ofrecer los resultados en mmol /24 h.

Notas

Todo el material a usar debe estar libre de amoniaco, metales pesados o detergentes. Evitar contactos con las manos o contaminación con gotas de sudor.

Intervalo de referencia

De 1,7 a 8,3 mmol/L en suero y 333 – 582 mmol/24h en orina.

Chequeo del resultado

- Si el valor de la urea > 150.0 mg/dl, repetir la medida.
- Si el valor del resultado repetido es el mismo, se puede entregar.
- Si el valor del resultado repetido es diferente, procesar nuevamente la muestra utilizando un control patológico.
- Con valores de urea ≥ de 400 mg/dl, repetir la medida, sea concentrada y diluida 1/2 con solución fisiológica y con un control patológico.
- Si la confrontación del valor concentrado está sobrepuesto al suero diluido y el control está dentro el rango establecido, se puede entregar el resultado.
- Si el suero diluido no está en relación con el suero concentrado, diluir la muestra 1/3 con solución fisiológica, siempre usando el control patológico.

Interferencias

Las interferencias más significativas son: Hemólisis- con Hb \geq 10.0 g/l; Ictericia: con bilirrubina \geq 60.0 mg/dl; Lipemia- con triglicéridos \geq 2000.0 mg/dl.

Criterios de validación de los resultados:

- Confrontar los parámetros de la funcionalidad del riñón (creatinina, aclaramiento de la creatinina, proteínas urinarias, densidad urinaria).
- Confrontar parámetros del equilibrio electrolítico (sodio, potasio, cloro).
- Confrontar parámetros de funcionalidad hepática (AST, ALT, GGT).
- Controlar parámetros metabólicos (glucosa, ácido úrico; colesterol, HDL, LDL).
- Controlar eventual estado de embarazo.
- Confrontar con funcionalidad suprarrenal.

Comunicación de riesgo

Se tiene que comunicar inmediatamente con valores superiores a 100.0 mg/dl.

Control de Calidad

Se deberán usar sueros, control normal y patológico, en las mismas condiciones que las muestras.

➤ Enzima Creatinasa

Generalidades

La creatinasa es una enzima que se encuentra en el reactivo de los métodos enzimáticos, punto final y cinético, que se realizan mediante la reacción de Jaffe con el propósito de cuantificar la creatinina presente en el suero. La creatinina es una sustancia que deriva del metabolismo muscular (músculo estriado, liso y cardíaco) de la creatina y representa el subproducto de excreción. La producción de creatinina es independiente de la dieta y del ejercicio muscular; sin embargo, es proporcional dentro de ciertos límites a la masa muscular. Se libera de los glomérulos y no es reabsorbida por los túbulos, de los cuales puede ser excretada, especialmente cuando se aumenta la concentración hemática. El aumento de la creatinina en el suero empieza a ser evidente cuando el filtrado glomerular es por debajo de 60 ml por minuto.

Indicaciones

La determinación de la creatinina es utilizada en el diagnóstico de las enfermedades renales agudas o crónicas, y también para el monitoreo de la diálisis renal. El aumento de la creatinina es un índice de la insuficiencia glomerular en cuanto ésta es eliminada por filtración glomerular. Mientras la uremia en la sangre puede ser controlada a través de una oportuna dieta, la creatinina se correlaciona casi exclusivamente a la eficiencia de la filtración glomerular. La creatinina representa el índice más fiel de la insuficiencia renal. La creatinina, compuesto sumamente difusible, se elimina del organismo casi exclusivamente por filtración renal. Su determinación en suero, así como el

clareance de creatinina endógena constituyen parámetros importantes para el diagnóstico de diversas afecciones renales. Las variaciones de las concentraciones sanguíneas de Creatinina competen fundamentalmente a las especialidades de Nefrología y Urología. Con este producto es posible realizar estudios de diagnóstico, seguimiento o el pronóstico de una enfermedad o condición clínica específica.

Muestreo

Suero, la creatinina es estable en suero 3 días a 2-8 °C

Modalidad de solicitud

La solicitud puede ser de carácter rutinaria (ayuna) o emergente, verificar la idoneidad del muestreo en lo que es la identificación, presencia de coágulos, lipemia, hemolisis, filamentos de fibrina, turbidez. Señalar eventualmente en el resultado la no idoneidad de la muestra; transportar a temperatura ambiente; Centrifugar a 3000 r.p.m por 5 mnts; La toma de muestra se puede conservar por 1 día a temperatura ambiente de 20-25°C, 7 días a 2-4°C y 6 meses en congelación.

Métodos

Para la determinación de la creatinina se puede emplear dos **métodos, el de punto final y cinético**, ambos enzimáticos mediante la **reacción de Jaffé**. El reactivo de Jaffé está constituido por ácido pícrico- 14,62mmol/l(R1); Hidróxido de sodio-1,25mol/l(R2) y creatinina 177micromol/l como blanco-muestra(sol. referencia) útil para contrarrestar las interferencias. Estos dos métodos se diferencian uno del otro en los siguientes aspectos:

→En el de punto final se debe desproteinizar la muestra, con vista a trabajar con un filtrado libre de proteínas, mientras que en el cinético se obvia ese paso;

→En el de punto final se lee a una longitud de onda de 500nm, y 510nm en el cinético;

En el de punto final, para la preparación de la solución de trabajo se mezcla 1volumen de ac.picrico con 4 volúmenes de NaOH, mientras que en el cinético se mezcla 1volumen de ac.picrico con 9 volúmenes de NaOH. Pero en ambos casos, la solución reactiva se preparó al momento del procesamiento y en caso de sobrar se debe desechar.

Metódicas de determinación cinético y de punto final)

- Método físico

Absorción de la creatinina sobre la resina a cambio iónico y medir la absorbancia a 235 nm.

- Método cinético enzimático

El método enzimático colorimétrico consiste en la medida del color desarrollado con el reactivo de Jaffe, antes y después de una reacción con la enzima específica, la creatin cinasa; esta enzima transforma la creatinina en creatina con medida final a 340 nm de la creatina.

Técnica

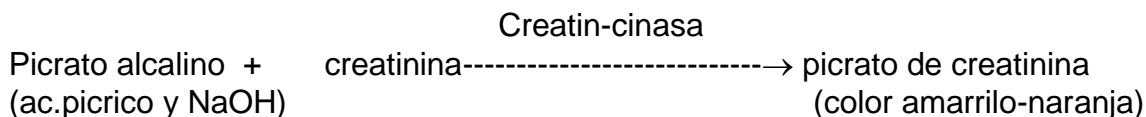
Mezclar bien 1ml del reactivo con 0,1ml de suero y transferir la solución a una cubeta. Exactamente 10 s después de ser añadida la muestra o la referencia, tomar la primera lectura (A1) y exactamente 1 min después realizar una segunda lectura (A2). La determinación de la absorbancia se realiza a una longitud de onda de 510 nm y a una temperatura de 37 °C.

Método colorimétrico y procedimiento analítico de punto final

Además de la determinación de la creatinina con una técnica de punto final, más frecuentemente se utiliza una técnica cinética en la cual la creatinina en medio alcalino reacciona con picrato produciendo un complejo coloreado rojo-naranja; la diferencia de absorción durante el tiempo de conversión es directamente proporcional a la concentración de creatinina en la muestra.

Principio del método.

Determinación colorimétrica de la Creatinina por la reacción con el ácido pícrico en medio alcalino, obteniéndose un complejo de color amarillo rojizo que es proporcional a la concentración de Creatinina en suero.



Por lo que, la creatina se convierte **en fosfocreatina** útil para la contracción muscular por la acción de enzima y espontáneamente a su vez va convirtiéndose en anhídrido (creatinina) inútil para el organismo, de allí que resulta ser expulsado por los órganos de excreción.

Técnica punto final

Reactivo de trabajo: mezcle un volumen del reactivo 2 con 4 volúmenes del reactivo 1. Reactivo 3: Tomar 10 volúmenes del reactivo y diluir hasta 100 volúmenes con agua purificada en frasco volumétrico. Los reactivos una vez abiertos son estables durante 6 meses conservados de 2 a 8 °C El reactivo de trabajo debe ser preparado en el momento de ser utilizado. Desechar el resto al finalizar la jornada laboral. Y los resultados se escriben con una cifra decimal.

Cálculo de la concentración de creatinina

$$\frac{\text{Absorbancia Muestra (1y2)}}{\text{Absorbancia Patrón (1y2)}} \times \text{CP} = \text{CM}$$

Valor de referencia: De 47,83 a 113,4

Interferencias

Concentraciones de bilirrubina superiores a 85 $\mu\text{mol/L}$ sobreestiman los valores normales de Creatinina. La lectura de la absorbancia de la muestra debe realizarse en el tiempo reportado para ambos métodos, de no ser así existirían interferencias de compuestos tales como: ácido ascórbico, hemoglobina, piruvato y glucosa entre otros.

Criterios de validación

Confrontar parámetros de funcionalidad renal (urea, potasio, proteínas, densidad urinaria); Confrontar parámetros de equilibrio electrolíticos (sodio, potasio, cloro); Controlar sexo y edad del paciente y también eventual estado de embarazo y Controlar parámetros del metabolismo muscular (CPK, móglobulina).

Comunicación de riesgo

Se tiene que comunicar inmediatamente con valores ≥ 6.0 mg/dl.

➤ Enzima Uricasa

La uricasa es una enzima que se encuentra en el reactivo de los métodos Uric Ácid Mono SL que se utiliza para determinar los niveles de ácido úrico en el suero. El ácido úrico es el producto final del catabolismo de las purinas (adenina, guanina) provenientes del exterior con la alimentación (parte exógena) y del interior con el ácido nucleico (parte endógena). Todas las purinas se transforman en xantina e hipoxantina; después, la enzima xantina-oxidasa las oxida y las convierte en ácido úrico. Al hombre, a diferencia de todas las especies animales, le falta la enzima uricasa, y no puede transformar el ácido úrico en alantoína. El ácido úrico es poco soluble en la sangre, se encuentra en forma de urato monosódico y está ligado a proteínas (albúmina, alfa 1 y alfa 2 globulina). La mayor parte del ácido úrico es eliminada por el riñón a través de un mecanismo de filtración, reabsorción y excreción.

Indicaciones

La alteración puede estar relacionada con dietas ricas en purinas o con aumentada producción endógena o con una reducida excreción.

La determinación del nivel del ácido úrico está indicado en el diagnóstico y monitoreo de algunos desórdenes metabólicos dietéticos: gota, síndrome dismetabólico alimenticio, neoplasia linfomielo-proliferativa (como linfomas, leucemias, policitemia), anemia hemolítica, enfermedad del riñón y pacientes en terapias citostática o radioterapia. Por lo que, los niveles de ácido úrico están asociados al nitrógeno retenido, la urea, la creatinina y otros constituyentes no proteicos.

Muestreo

Suero o plasma. El ácido úrico es estable de 3 a 5 días en suero a 2-8 °C. y Orina: Diluir la orina, 0.1 ml (100 µl) de muestra con 0.9 ml (900 µl) de agua destilada (dilución 1:10), multiplicar el resultado por 10 y multiplicar por el volumen de orina en litros y dividir entre 1000. Ofrecer los resultados en mmol /24 h).

La solicitud es solamente de carácter rutinaria en ayuna, con previo preparación del paciente, verificar la idoneidad del muestreo en lo que es la identificación, hemólisis, lipemia, presencia de coágulos, filamentos de fibrina, turbidez. Señalar eventualmente en el resultado la no idoneidad de la muestra; transportar a temperatura ambiente; Centrifugar a 3000 r.p.m por 5 mnts y separar del suero; transportar a temperatura ambiente y conservar por 5 días a 2 - 4°C, 6 semanas en congelación a -20°C.

Metódicas de determinación

- Método colorimétrico

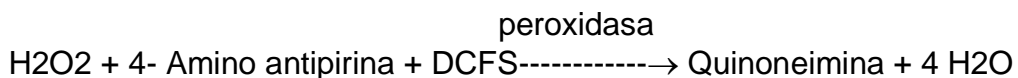
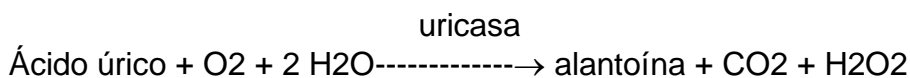
El ácido úrico en ambiente alcalino reduce el ácido fosfotúngstico con formación de color azul; la intensidad del color es proporcional a la cantidad de ácido úrico. Antes de desproteinizar con el Folin Wu.

- Método físico-enzimático

El ácido úrico presenta en ultravioleta un pico de absorbancia alrededor de 290 nm; la absorbancia a esa longitud de onda está completamente eliminada por la acción de la uricasa, la cual transforma el ácido úrico en alantoína. Por la disminución de la extinción óptica, se conoce la concentración del ácido úrico.

Método enzimático

El ácido úrico es oxidado por la uricasa a alantoína y peróxido de hidrógeno que, en presencia de POD y 4-AF y DCPS, forma un compuesto rosáceo.



Procedimiento

Mezclar e incubar 5 minutos a 37 °C ó 10 minutos a temperatura ambiente. Ajustar a cero con blanco reactivo. Efectuar las lecturas a **505 nm** (490-550) de las absorbancias del estándar y de la muestra frente a blanco reactivo. Coloración estable como mínimo 30 minutos. O se puede seguir las instrucciones de la casa comercial.

Control de Calidad

Se deberá usar sueros, control normal y patológico, en las mismas condiciones que las muestras.

Notas sobre la metódica

Linealidad: La metódica es lineal hasta 25.0 mg/dl, esto es decir que el método es lineal hasta 1487 umol/l. Para concentraciones superiores mezclar 0.1 ml (100 μ l) de muestra con 0.2 ml (200 μ l) de cloruro de sodio al 0.9 % y repetir la determinación, multiplicar el resultado por 3.

Sensibilidad: La metódica tiene una sensibilidad de 0.2 mg/dl.

Especificidad

La metódica de uricasa es específica para el ácido úrico; sin embargo, también para los otros derivados de las purinas.

Interferencias

Pueden presentar interferencias: El suero icterico con bilirrubinas \geq 40.0 mg/dl; la hemólisis: HB \geq 10.0 g/l; el suero lipémico: triglicéridos \geq 2000 mg/dl; el ácido ascórbico \geq 30.0 mg/dl. Algunos fármacos pueden dar valores falsamente bajos de ácido úrico: fenacetina, aminofenolo, idralazina, metildopa, levadopa.

Valores de referencias

- Hombre 26 – 60 mg/L
- Mujer 35 – 32 mg/L
- Suero: M: 142 - 339 umol/l H: 202 - 416 umol/l
- Orina: 1.2 – 6 mmol/24 h.

Criterios de validación

Con valores muy elevados→

Confrontar otros parámetros en relación con procesos inflamatorios: conteo de glóbulos blancos, VSG, PCR, fibrinógeno; Controlar los parámetros de alteración metabólica: glucosa, colesterol, triglicéridos, apolipoproteínas.

Controlar los parámetros de los procesos displásicos: VSG, parámetros oncológicos, fórmula leucocitaria y glóbulos rojos; Controlar los parámetros de la funcionalidad del riñón: creatinina, electrolitos, examen de orina; Antes de la sintomatología dolorosa en la gota, se eleva el nivel de ácido úrico. Y el resultado se escribe con una sola cifra decimal

2.2.2. Enzimas como Herramientas de Trabajo en el Laboratorio de Anatomía Patológica.

➤ Enzima α Amilasa

La enzima α Amilasa se utiliza en la técnica del Acido periódico de Schiff (PAS) para la determinación del glucógeno, único glúcido almacenado no ligado a proteínas (libre) en el organismo de los mamíferos.

Como además del glucógeno, existen otras sustancias que son teñidas por el PAS, de allí que es necesario una preparación de control que elimine específicamente el glucógeno, tratase de la enzima amilasa, pues las estructuras que contienen el glucógeno aparecen teñidas con el PAS tan pronto cuando se somete a la amilasa; demostrándose así la presencia del glucógeno en el hígado y en el musculo estriado y se establece también el diagnostico de diversas afecciones que producen un deposito intracelular anormal del glucógeno.

2.2.3. Enzimas como Herramientas de Trabajo en el Laboratorio de Microbiología.

Para referirse de enzimas como herramientas de trabajo en el laboratorio de microbiología, estaríamos evidentemente ante un paso muy importante en el desarrollo de los medios de diagnósticos, prevención, control, tratamiento de múltiples enfermedades que han afectado la humanidad en un momento históricamente marcado por limitaciones científico – tecnológicas en cuya reversión se hace evidente desde los finales del pasado siglo debido la introducción de la automatización y medios de investigaciones altamente eficientes en los laboratorios microbiológicos. Por lo tanto, todos los métodos agrupados bajo la denominación común de inmunoensayos se basan en la reacción de una proteína (anticuerpo específico) con un antígeno marcado y con un antígeno endógeno (el que se quiere determinar). Ambos antígenos compiten por la unión con el anticuerpo y ello ha hecho que estas metodologías reciban también el nombre de ensayos de unión competitiva. Su introducción en la década de los 60 del siglo XX significó una verdadera revolución en el laboratorio médico. La sensibilidad del empleo de isótopos radiactivos primero y de otros ligandos después, unido a la alta especificidad de las proteínas de unión, hizo posible alcanzar la sensibilidad y especificidad necesarias para medir con precisión las concentraciones fisiológicas de sustancias que se encuentran en el plasma: en microgramos, nanogramos y picogramos.

Los primeros intentos de medir moléculas de interés médico en los fluidos biológicos, datan de la década del 40 del siglo XX, y concernieron principalmente a metabolitos tales como glucosa, urea y enzimas, ya que estas podían transformar muchas moléculas de sustrato, también la determinación de la presencia de antígenos en macro reacciones inmunológicas. Sin embargo, una importante

cantidad de sustancias y especies de interés vital, no podían medirse o detectarse directamente, ni podían someterse al análisis enzimático, o estaban presentes en concentraciones muy pequeñas para su detección por los métodos clásicos de química clínica.

A partir de las últimas décadas del pasado siglo creció el interés por aquellos métodos de análisis que aprovechan la gran sensibilidad y especificidad de las reacciones inmunológicas, potenciadas con la aparición de los inmunoensayos y posteriormente los enzimoimmunoensayos (EIE) que se presumen en ELISA lo que ha permitido detectar sustancias presentes en concentraciones muy pequeñas en muestras biológicas y el actual método ultramicroanalítico también conocido por ultramicroELISA, que visualiza especies ultramicroscópicas cuya observación con simples inmunoensayos o radioinmunoensayos no era posible, teniendo de este modo gran significado en la práctica médica posibilitado por el empleo de enzimas como marcadores de las reacciones librando al ser humano del efecto de las radiaciones que anteriormente se emitían en los radio inmunoensayos así como la posibilidad de visualizar reacciones de especies muy pequeños (VIH).

En el año de **1950**, Coons y Kaplan describieron los métodos de marcaje fluorescente de Ac para la técnica de Inmunofluorescencia, pero, esta no podía detectar antígenos en muestras ultramicroscópicas, ya en **1959-1960** surgen las Técnicas de Radio inmunoensayo (RIA), a partir de los trabajos de Yalow y Berson, donde presentan un método para la detección de algunas sustancias, las cuales estaban marcadas con isótopos, las cuales constituían antígenos para determinados anticuerpos. Sin embargo debido a que el tiempo de vida media de mucho de los isótopos radiactivos es limitada, el efecto dañino de las radiaciones tanto para la salud humana de los operadores como para el ambiente, así como la necesidad de separar los anticuerpos unidos a los antígenos marcados y no marcados, además del alto costo de los equipos contadores de radiactividad y las restricciones legales en el uso de marcadores radioactivos en algunos países, motivó a que muchos investigadores desarrollaran otros métodos de inmunoensayo en los que utilizaban marcadores no isotópicos, fue cuando en **1971** se reportan métodos enzimoimmunoensayos conocidas como técnicas **ELISA** (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) descritas casi al mismo tiempo por dos grupos de trabajo, el de Eva Engvall y Perlman en Suecia y el de Van Wemeeen y Schuurs en Holanda, utilizando tubos de polietileno como soporte o fase sólida en que fijaron anticuerpos, a los que se enlazaban los antígenos o sustancias a detectar, a éstas posteriormente se le unían anticuerpos marcados con enzimas, y en los años de 1972 y 1975 se desarrollan procedimientos de inmunoensayo homogéneo y el de obtención de anticuerpos monoclonales dados por Rubenstein y Kolher respectivamente.

2.2.3.1. Definiciones Importantes

- Inmunidad

Conjunto de mecanismos fisiológicos que permiten reconocer, neutralizar y eliminar sustancias identificadas por el organismo como ajenas a él.

- Antígeno (Ag)

Sustancia extraña al organismo, capaz de combinarse con los efectores de la respuesta inmunológica. Por su naturaleza pueden ser proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos.

- Anticuerpos(Ac)

Sustancias producidas por el organismo en respuesta a un determinado antígeno (en respuesta a un determinado estímulo inmunogénico), su función fundamental es interactuar con los antígenos. Por lo que puede considerarse anticuerpo, cualquiera de las cerca de un millón de tipos de moléculas proteicas que producen más células denominadas linfocitos, y cuyo papel principal es actuar como defensas contra la invasión de sustancias extrañas. Los anticuerpos, que son un componente importante del sistema inmunológico, están en todos los vertebrados, en la fracción de la sangre llamada gammaglobulina.

- Enzimoimmunoensayo(EIE)

inmunoensayos en los cuales la detección del compuesto a determinar es realizada al evaluar los cambios de concentración en el producto de una reacción enzimática fundamentadas en las reacciones antígeno-anticuerpo y enzima-sustrato.

2.2.3.2. Técnicas inmunoenzimáticas

Las técnicas inmunoenzimáticas forman parte de las reacciones serológicas que utilizan conjugados, los cuales deben poseer actividad inmunológica y enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte, la reacción Ag-Ac quedará inmovilizada y por tanto podrá ser revelada mediante la adición de sustrato específico que al actuar sobre la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de espectrofotómetro o colorímetro.

Ag + AC Agm + E + S -----> Producto de la reacción

La continuidad de este proceso de inmunodiagnóstico es asegurado por la existencia de la muestra que puede ser el antígeno o anticuerpo, con un conjugado que es el enlace entre propiedades inmunológicas y enzimáticas y el sustrato que evidencian la ocurrencia de las reacciones dadas por los cambios de

color, turbidez, luz fluorescencia y radiaciones que podrían ser visualizados por distintos equipos como espectrofotométricos, colorimétricos, turbimétricos, etc.

Enzimas más utilizadas en técnicas de enzimoimmunoensayos: Peroxidasa, Fosfatasa alcalina, Beta galactosidasa, Glucosa oxidasa, Mlato-Deshidrogenasa, Glucosa GP-Deshidrogenasa.

¿Por qué si existen diversos marcadores se prefieren las enzimas como marcadores de Ag o Ac?

Fundamentalmente se prefiera las enzimas como marcadores en estos inmunoensayos debido a su alto grado de especificidad, estabilidad en condiciones de almacenamiento y de test, fácil obtención en el mercado, baratas, gran cantidad de sustratos disponibles: fluorogénicos-cromogénicos, forman conjugados estables y conservan su actividad después de la conjugación, no se contaminan, no requiere de permiso para su uso. Además de no producir efectos dañinos al manipulador como era el caso de los radioinmunoensayos

2.2.3.3. Tipos de enzimoimmunoensayos

- 1) De acuerdo a si requiere o no separación de los componentes del sistema Pueden ser homogéneos, heterogéneos.
- 2) De acuerdo a la naturaleza de la reacción
 - a) Competitivos - con antígeno conjugado a enzima y con anticuerpo conjugado a enzima.
 - b) No competitivos- tipo sándwich o doble anticuerpos Indirecto y modificación del doble anticuerpo (captura).
- 3) De acuerdo a la fase en que se realizan: Fase sólida y líquida
- 4) De acuerdo al objetivo que persiguen: Cuantitativos y Cualitativos
- 5) De acuerdo al trabajo en rangos (volúmenes de trabajo): Macro, micro y ultramicroanálisis.
- 6) De acuerdo a la sustancia marcadora: Isotópicos y no isotópicos
- 7) De acuerdo a la actividad del ensayo: Amplificación y modulación.

Técnica de enzyme-linked-immunoabsorbent assay(ELISA)

El término ELISA proviene de las siglas en ingles enzyme-linked-immunoabsorbent assay cuya traducción es ensayo de inmuno absorción con anticuerpos ligados a enzima ósea anticuerpos acoplados a enzima cuyo principio se basa en: el suero antiglobulínico o los anticuerpos anti-immunoglobulina como por ejemplo el anti-IgG se acopla a una enzima para formar un conjugado desarrollándose un color proporcionar a la cantidad de anticuerpos fijados; pudiéndose estimar por la medición de la densidad óptica que ofrece un valor numérico.

Resulta importante a profundizar de los EIE heterogéneos más conocidos con el nombre **ELISA** (enzyme-linked-immunoabsorbent assay), visto que son la base

fundamental del funcionamiento del SUMA, Fueron los primeros en ser descubiertos, que pueden ser directo, indirecto, sándwich y captura. Por tanto en esta técnica el conjugado fijado en la reacción y el libre pueden ser separados físicamente para poder evaluar el resultado de la técnica.

La técnica de enzimoimmunoensayo (ELISA) se desarrolló a partir del RIA. La diferencia fundamental es la sustitución del isótopo por la unión de una enzima al anticuerpo, que “activa” al marcador alternativo (sustancia que emite la señal), cuando se libera al producirse la unión del anticuerpo con el antígeno que se quiere detectar. Por lo general, ello acorta el tiempo de incubación de los ensayos, y agiliza el procedimiento.

La mayor parte de los enzimoimmunoensayos son de origen comercial, desarrollados originalmente en pequeños viales. En la actualidad se utilizan microplacas que facilitan el trabajo, muchas de ellas con pocillos desprendibles para ahorrar reactivos. La selección del método que se va a emplear depende de varios factores: del tipo de muestra biológica que trabaja, del tipo de pacientes que es atendido en el centro de salud y, sobre todo, de la relación costo beneficio que se espera, así como de las posibilidades económicas con que se cuenta. Por lo general, los equipos de última tecnología para inmunoensayo procesan volúmenes de muestras de alrededor de 90 muestras por hora, hasta 120 muestras por hora, con muy buena eficiencia. Estos pueden desarrollar varios ensayos para la misma muestra. De **acuerdo a la actividad del ensayo**: Amplificación y modulación.

2.2.3.4. Sistema Ultra Micro Analítico (SUMA).

Tecnología SUMA: Sistema integral que incluye equipos, reactivos y software.

Resulta interesante tener en cuenta que los ELISA pueden estar en laboratorios de todo el mundo sin embargo hablar de SUMA es reconocer una tecnología cubana.

¿Por qué surge la Tecnología SUMA?

La situación de la mortalidad infantil cubana había experimentado cambios significativos en la década de los años 70, como consecuencia de la aplicación de un plan de medidas sanitarias y preventivas, e innumerables inversiones en centros asistenciales, así como el establecimiento de un sistema médico preventivo y asistencial.

Las enfermedades infecciosas y diarreicas agudas, así como las infecciones perinatales en general, mostraron disminuciones sostenidas y comenzaron entonces a hacerse evidentes otras causas de enfermedad y de muertes, que por su relativa baja frecuencia habían resultado menos importantes como es el caso de las malformaciones congénitas y de las enfermedades hereditarias y genéticas.

Sin embargo, para enfrentar esta nueva problemática de salud se requería del establecimiento de un efectivo sistema de atención primaria, y de la realización de

estudios a escala masiva, con el objetivo de detectar y/o evitar de manera precoz las enfermedades que de una u otra manera afectan la calidad de vida del ser humano, fue así que en 1979, se inició el desarrollo de una técnica que permitiría estudiar un gran número de muestras, con el más bajo costo posible, conjugando las ventajas de los métodos ELISA pero utilizando ultra micro volúmenes (10 microlitros de muestras y reactivos).

El desarrollo a escala de laboratorio de un ultra micro método de inmunoensayo de 10 microlitros para la cuantificación de AFP en el suero de las gestantes y del instrumental necesario, condicionaron el surgimiento, desarrollo y aplicación de lo que posteriormente sería la tecnología SUMA como un sistema de diagnóstico integral basado en las técnicas de inmunoensayo.

2.2.3.4.1. Componentes de la tecnología SUMA

- Lavador MAS 301, MW 2001; Lector PR 521; Estuches de reactivos

En la actualidad en el CIE se diseñan y se producen todos los equipos necesarios para llevar a cabo los programas de pesquizaje con la mejor calidad y a un costo mínimo.



Labador



Lector de Placas



Computadora



Macro y Micro placas



Estuche de Reactivos

Además de trabajar de modo autónomo, este equipo se puede acoplar a una computadora y trabajarlo con un programa especializado (Strip Reader Software). La versión más actual de este programa es la 8.0.

2.2.3.5. Aplicaciones de la tecnología SUMA

En la actualidad existen 176 laboratorios instalados en nuestro país que utilizan la tecnología SUMA (Red Nacional de Laboratorios SUMA) ya sea en Hospitales Maternos, Banco de Sangre, policlínicos como en Centros de Higiene y Epidemiología, destinados a servir a toda la población en general y su buen funcionamiento depende no sólo de la calidad de los equipos y reactivos, sino también de la capacitación del personal que en ellos labora, constituyendo un modelo de organización para pesquizajes masivos en países en vías de desarrollo. Además nuestra tecnología se utiliza en otros países como Venezuela, Brasil, Argentina, México, Colombia y China.

En todas determinaciones por el método SUMA se utilizara como marcador la única enzima (fosfatasa alcalina) que genera un producto fluorescente pero con una variación de la placa que viene de la fábrica especificada así como la estucha de cada tipo de determinación.

Con la metodología establecida y partiendo del modelo inicial del UMELISA-AFP se desarrollaron más de 20 ensayos diferentes, los cuales se aplican en diversos programas de salud. El desarrollo y aplicación de la tecnología SUMA en los últimos 17 años ha estado orientada fundamentalmente a programas o aplicaciones de salud en tres líneas de trabajo principales:

1- Certificación de sangre

- UMELISA HIV 1,2 recombinante detección de anticuerpos al VIH1 y 2 en suero, plasma y sangre seca;
- UMELISA HTLV I-II suero, plasma y sangre seca sobre papel de filtro;
- UMELISA HBs Ag PLUS determinación de antígeno de superficie del VHB;
- Test HbsAg Confirmatory confirmación de muestras positivas;

- UMELISA Anti HBsAg para detección de anticuerpos anti HbsAg en suero humano;
- UMELISA Anti HBc para la detección al antígeno core del virus de la Hepatitis B en suero humano;
- UMELISA Chagas detección de anticuerpos IgG al *Tripanosoma cruzi*;
- UMELISA HCV detección de anticuerpos al virus de la hepatitis C.

2- Vigilancia epidemiológica

- UMELISA Dengue IgM detección de anticuerpos IgM al virus del Dengue
- UMELISA Dengue IgG detección de anticuerpos IgG
- UMELISA Hansen detección de anticuerpos IgM al *Micobacterium leprae*
- UMELISA Tetanus determinación de anticuerpos IgG al toxoide tetánico
- UMELISA Chagas detección de anticuerpos al *Tripanosoma cruzi*
- UMELISA *Toxoplasma* determinación de anticuerpos IgG al *Toxoplasma gondii*

3- Materno infantil

Para la atención prenatal y neonatal dispone de estuches UMELISA con fines de:

- Detección de alfa feto proteína en suero y líquido amniótico (AFP);
- Determinación cuantitativa de Inmunoglobulina G (IgG);
- Determinación de gonadotropina coriónica en suero u orina (HCG)-embarazos;
- T4 neonatal para determinar tiroxina total en sangre seca sobre pf;
- Detectar cuantitativamente hormona estimulante del tiroides (tirotropina - TSH) en sangre seca sobre papel de filtro.

2.2.3.5.1. Algunos de los exámenes más frecuentes en laboratorio de SUMA

1- Pruebas de diagnóstico y certificación de sangre

a) Prueba de diagnóstico del VIH

El **VIH** es un retrovirus humano que pertenece al género de los Lentivirus que muestra especial afinidad por los linfocitos T los que expresan el marcador fenotípico CD4 en su superficie, afecta también otros componentes del sistema inmunitario tales como monocitos, macrófagos, células dendríticas tisulares.

Tipos de VIH: hasta la fecha se conoce dos especies “el **VIH1** y **VIH2**”, de los cuales el tipo 1 es el más extendido en el mundo debido a que es de fácil transmisión causando enfermedades con mayor rapidez y frecuencia, más virulento siendo así el responsable de la actual pandemia y existen más de 120 cepas y 3 grupos grandes M, N, O. Dentro del grupo M se encuentran los subtipos A,B,C ,D ,F, G,H el E y el I han dejado de existir como subtipos independientes para convertirse en subtipos recombinantes, mientras que el VIH tipo 2 es de difícil transmisión, menos virulento y está limitado hacia zonas de África Occidental.

Características y composición del VIH

Las partículas víricas tienen la forma de pequeñas esferas y cada una lleva unas ochenta puntas pequeñas y redondeadas en forma de gancho. Cada gancho contiene varias moléculas de una gran proteína, la **gp120** que presenta una afinidad muy acusada con los receptores específicos de los linfocitos T4 (o CD4). Asociadas a proteínas más pequeñas transmembranales, denominadas **gp41**, las moléculas de gp120 permiten, después de la adhesión inicial de virus a la célula, la fusión de la envoltura del virus con la membrana de la célula y así el paso de los constituyentes internos del virus al interior de la célula. Es probable que esa fusión dependa de un cambio de estructura de la gp120, relacionado éste con una fijación de una de sus partes a otro receptor de la superficie de la célula.

Los componentes internos del virus, aquellos que penetran en la célula, constituyen la nucleocápside, formada por dos células idénticas de ARN y de proteínas, entre las que se encuentra la famosa enzima de replicación, la **transcriptasa inversa**, y proteínas internas de envoltura, las principales de las cuales son las **p24** (aún denominadas **p25**), **p18**, **p7** y **p9**. Estas proteínas internas están codificadas por un gen denominado **gag** y son sintetizadas en primer lugar en forma de una cinta larga que es cortada inmediatamente por otra enzima específica del virus, denominada **proteasa**. Muchas de las investigaciones se han centrado en la puesta a punto de los inhibidores específicos de estas dos enzimas, la transcriptasa inversa y la proteasa.

Las pruebas de laboratorio están recomendadas para la detección de respuesta y evolución inmunológica o vírica, valorar la respuesta a los anti retrovirus y seguimiento que se basa en la demostración de los anticuerpos anti-VIH y serologías, así como el cultivo del virus in vivo.

La expansión del acceso al asesoramiento y las pruebas del VIH es un imperativo tanto de salud pública como de derechos humanos, por lo que en las nuevas indicaciones de la OMS y el ONUSIDA se aconseja que, en todo el mundo, los proveedores de atención recomienden el asesoramiento y las pruebas del VIH a todos los pacientes que acudan al médico con dolencias sospechosas de infección por VIH, pero al mismo tiempo, y en todos los casos de asesoramiento y pruebas del VIH, se deben respetar las 3 C: consentimiento, confidencialidad y consejo.

Para el diagnóstico se emplean dos tipos de pruebas:

1-Pruebas de pesquizaje – Enzyme Linked Inmunoabsorbent Assay (ELISA) y tiras reactivas, son pruebas simples, baratas y rápidas.

2- Pruebas confirmatorias o moleculares - Western blot; Reacción en cadena de las polimerasas (PCR); Inmunofluorescencia indirecta (IFI); aislamiento viral.

Por la historia natural de la enfermedad sin tratamiento, la cual se manifiesta en diferentes fases ocupando cada una distintas particularidades.

Periodo de Ventana: en esta etapa el virus se puede detectar solo por pruebas moleculares y abarca desde la entrada del virus al organismo hasta el comienzo de la siguiente fase. Dentro de este mismo periodo se encuentra la etapa precoz y aguda donde el virus comienza a multiplicarse de forma activa y puede desarrollar o no síntomas, presentando alta carga viral lo que le resulta muy infeccioso. La infección se detecta por aislamiento viral, presencia de antígeno P24 en el suero, el UMELISA VIH-1y VIH-2 negativo. El tiempo que transcurre entre el contagio y la seroconversión que varía entre 2semanas hasta 3 meses pudiéndose extender a 6 meses en algunos individuos.

Periodo de incubación o fase intermedia o crónica: se detectan anticuerpos en el suero pero no antígenos circulantes, puede durar de 10 a 15 años, abarca desde el inicio de la infección hasta la de los primeros síntomas clínicos, por tanto el paciente es asintomático, carga viral disminuye, UMELISA y Western blot reactivos.

Fase final o de crisis : se caracteriza por alta carga viral, derrumbe del sistema inmune , disminución de los linfocitos TCD 4 , aumento del antígeno P 24 , disminución de los anticuerpos y la aparición de las infecciones oportunistas. Se evidencia la enfermedad en cuyo periodo puede prolongar con el tratamiento antirretroviral.

El UMELISA VIH 1+2 Recombinant -es un ensayo inmunoenzimático indirecto para la determinación de anticuerpos al VIH en suero, plasma, o sangre fresca sobre papel de filtro que emplea como antígenos de captura la **gp120, gp41, y p24**, proteínas representativa de la envoltura y el núcleo del Vih1 así como la **gp36** proteína representativa de la envoltura del Vih2 obtenidas por métodos recombinantes y péptidos sintéticos, basado en el ELISA (análisis inmuno absorbente ligando a enzimas) que emplea el equipo SUMA (Sistema Ultra Micro Analítico) en el que su grado de automatización ha permitido la reducción del tiempo total del ensayo por ende el tiempo de espera de los resultados.

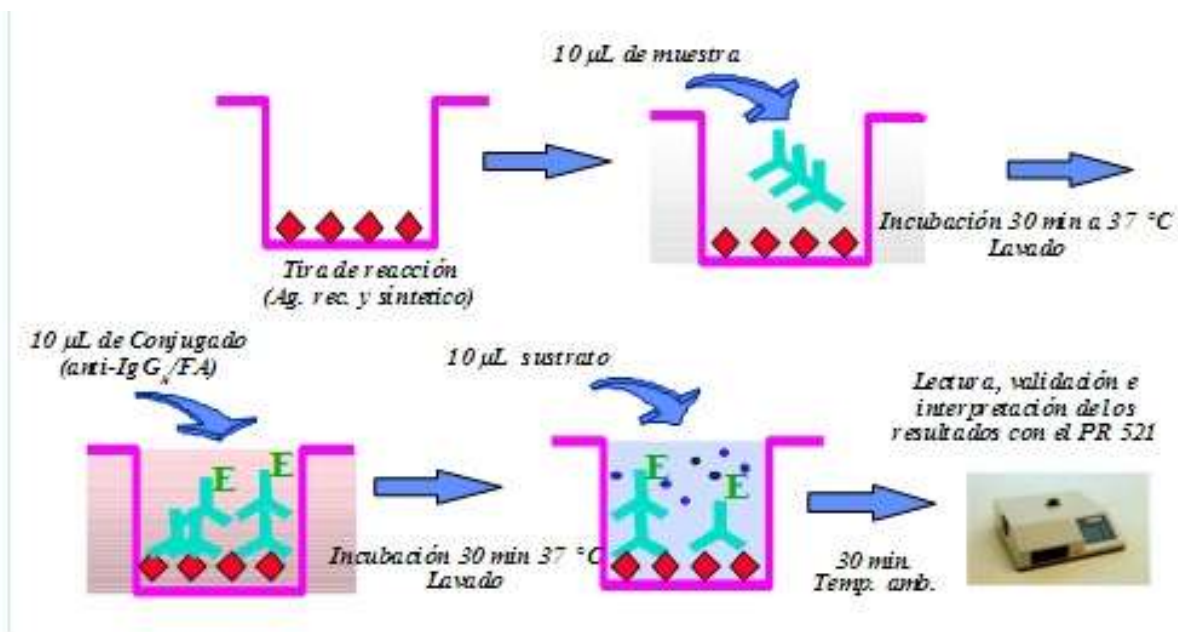
El Western Blot es la metodología más utilizada para determinar la reactividad al UMELISA y se aplica a una segunda muestra para confirmar el diagnóstico Se basa en el principio de un ELISA indirecto. Como fase sólida utiliza las tiras de nitrocelulosa donde previamente se han fijado proteínas estructurales del VIH-1. Como sistema revelado emplea inmunoglobulina G de conejo antihumana marcada con peroxidasa y sustrato cromogénico peróxido de hidrogeno.

La técnica **UMELISA HIV 1+2 Recombinant** es un examen preliminar más empleada en nuestro sistema sanitario, pero no es determinante, por eso se recomienda la repetitividad y en casos positivos se debe hacer tres veces el ensayo y después hacérselo el confirmativo.

Principio de fundamentación del ensayo

Ensayo inmunoenzimático indirecto; Fase sólida tiras de UltramicroELISA recubiertas con los antígenos; Se añade la muestra en los pocillos de la placa de reacción y si contiene anticuerpos específicos, se fijan al antígeno del recubrimiento; Se añade conjugado Anti IgG humana-Fosfatasa alcalina el cual se unirá a los anticuerpos fijados en la reacción anterior; Al añadir un sustrato fluorogénico(4metilumbeliferilfosfato), este será hidrolizado y la intensidad de la fluorescencia emitida permitirá detectar la presencia de anticuerpos al VIH1 o VIH2 en la muestra. Las cantidades de la muestra, enzima y sustrato adicionados en el procedimiento siempre será de 10 microlitros, así como la temperatura de incubación de 37°C; Sensibilidad y especificidad 100%.(figura1.13)

Figura 1.12. Procedimiento del UMELISA HV 1-2. Recombinat



Tomado de los Manuales de SUMA

El procesamiento de la información se puede realizar directamente en el equipo, mediante funciones establecidas en el o a través de una computadora acoplada vía RS-232, permitiendo el uso de programas más diversos y especializados, suministrados por el fabricante.

Tratamiento con Antirretrovirales

Muchas de las investigaciones se han centrado en la puesta a punto de los inhibidores específicos de las dos enzimas, la **transcriptasa inversa** (enzima de replicación) y la **proteasa** (proteínas internas de la envoltura) que integran a los componentes internos del virus, los que penetran en la célula constituyendo la nucleocápside formada por dos células idénticas de ARN y de proteínas, las principales de las cuales son las p24 (aún denominadas p25), p18, p7 y p9. Estas proteínas internas están codificadas por un gen denominado **gag** y son sintetizadas en primer lugar en forma de una cinta larga que es cortada inmediatamente por otra enzima específica del virus, denominada **proteasa**.

El curso clínico de la enfermedad es funesto, sin embargo el pronóstico de la infección por VIH ha cambiado radicalmente con la aparición de fármacos antirretrovirales que inhiben la retrotranscriptasa inversa y los de la proteasa, en cuya administración combinada permiten detener la evolución de la enfermedad e incluso mantener la viremia en tasas prácticamente indetectables, aun poca porcentaje de enfermos de SIDA en el mundo se benefician de este tratamiento.

Crterios para el inicio del tratamiento con antirretrovirales según la OMS:

- Sintomática de SIDA en el estadio IV
- Carga viral superior 5 000 ò 10 000 copias/ml de sangre
- Sintomático de SIDA en el estadio III con CD4 (T4) menor de 350 células/ml de sangre.
- Sintomático o asintomático con CD4 menor de 200 células/ml de sangre, pero en todos los nos casos el inicio del tratamiento debe ser precedido de una equitativa preparación del paciente o familiares de este, ya que una vez iniciado la quimioterapia será para toda su vida.

Grupos Farmacológicos más utilizados

- 1- Inhibidores nucleosídicos de la retrotranscriptasa inversa**, donde encontramos combinaciones de zidovudine (AZT), lamivudine (3TC), stavudine (D4T), didanosine (DDI), abacavir (ABC), tenofovir DF (TDF); Estas medicinas interfieren con un paso crítico durante el ciclo de vida del virus e impiden que este pueda reproducirse.
- 2- Inhibidores no nucleosídicos de la retrotranscriptasa inversa**, constituyen a este grupo la efaverenze (EFV) y niverapina (NVP), también conocidos como inhibidores de fusión, pues bloquean el virus de entrar en las células del cuerpo. **3-Inhibidores de la proteasa**, formados por la nelfinavir (NFV), indinavir (IDV), ritonavir (RTV),

lopinavir/rvt (LPV/r), saquinavir (SQr), que interfieren como efectores negativos del sitio alostérico de la proteína estructural del VIH que usa para producir las partículas virales infecciosas.

El esquema de la quimioterapia de primera línea es básicamente formado por dos fármacos del grupo 1 asociados a uno del segundo o tercer grupo, mientras que en la segunda fase se usa fármacos del grupo 2 y 3 pero no es muy adherido en la mayoría de los países por las políticas económicas debido a su alto costo en la adquisición, por lo que el precio de los tratamientos de primera línea ha bajado de forma alentadora en la mayoría de los países de ingreso bajo y en algunos países de ingreso mediano, la demanda de tratamientos costosos de segunda línea seguirá aumentando. A menos que los precios de los tratamientos de segunda línea bajen apreciablemente, las limitaciones presupuestarias podrían hacer peligrar a los programas de tratamiento.

b) Prueba de detección del antígeno de superficie de la Hepatitis B (HBsAg)

- UMELISA HBsAg PLUS

PRINCIPIOS

Análisis inmunoenzimático heterogéneo tipo “sándwich”

UMELISA HBs Ag

Análisis inmunoenzimático heterogéneo tipo “sandwich”

Muestras

Suero, plasma, sangre seca en papel de filtro.

→Se emplean las ventajas de la alta afinidad entre la estreptavidina y la biotina; Se usan tiras de ultramicroelisa de 8 pocillos por tiras, revestidos con; anticuerpos monoclonales murinos de alta afinidad contra el Antígeno de superficie; Si el HBsAg está presente los anticuerpos en su superficie lo capturan; Se añaden los anticuerpos biotilados que se unen a inmunocomplejo formado sobre la fase sólida; Se añade el conjugado Estreptavidina-Fosfatasa Alcalina; Se añade el sustrato fluorogénico 4 metil umbeliferil fostato que será hidrolizado y la intensidad de la fluorescencia emitida permitirá detectar el antígeno de superficie. Cuya Sensibilidad: 100%; Especificidad de 99,2%.

Esquema de reacción

Sustrato fluorogénico: 4 metil umbeliferil fostato
↑
Conjugado: complejo estreptavidina-biotina
↑
Anticuerpos biotilados
↑

Muestra: Antígeno de superficie???????

Fase sólida: ↑ anticuerpo monoclonal murino de alta afinidad contra el HBsAg

Características

- La muestra más frecuentemente utilizada para la determinación de antígeno de superficie es el suero, también se pueden procesar plasma o sangre seca sobre papel de filtro.
- Las tiras de ultramicroelisa están revestidas con anticuerpos monoclonales murinos de alta afinidad dirigidos contra el HBsAg.
- Si el antígeno de superficie está presente los anticuerpos en su superficie lo capturan.
- Se añaden anticuerpos monoclonales biotilados específicos contra el antígeno de superficie que se unirán al inmunocomplejo formado sobre la fase sólida.
- Se añade el conjugado Estreptavidina-Fosfatasa Alcalina
- El sustrato fluorogénico 4 metilumbeliferil fosfato será hidrolizado por la enzima fosfatasa alcalina y la intensidad de la fluorescencia emitida permitirá detectar la presencia del HBsAg en la muestra.

Este ensayo emplea las ventajas de alta afinidad entre la Estreptavidina y Biotina. tener HBsAg.

Leer precauciones del estuche

- Controles internos P al menos uno entre 75-180 UF N al menos dos entre 1-7 UF
- Al cumplir con los requisitos y finalizar el ensayo se garantiza la detección de 0,125 UPEI/ml de HBsAg para los subtipos ad y ay del VHB y 0,325 UI/ml para el subtipo ad según estándar secundario calibrado frente al patrón internacional de la OMS (ese valor es la detectabilidad del ensayo)
- El nivel de corte estará en las muestras en que $(F1-NN)/(P-NN)$ mayor o igual 0,03. Para cálculo manual es $0,03(P-NN) NN$; Sensibilidad 100% y especificidad 99,92 %.

Teste confirmatorio

- Se basa en el principio de la neutralización mediante el cual una muestra repetidamente positiva reaccionará con un suero neutralizante (suero de conejo anti-HBsAg positivo) y como referencia un suero control, libre de HBsAg (suero de conejo normal). Los anticuerpos en exceso neutralizarán los determinantes antigénicos de la muestra, lo que será demostrado por una disminución significativa de la señal de fluorescencia con respecto a la muestra tratada con el reactivo control.
- Con las muestras se trabaja puras y diluídas 1/101.

- Las muestras pura y diluída se enfrentan cada una a 20ul de control y 20ul de neutralizante (a 100ul de muestra)
- La relación PN/PC debe ser mayor de 0,5
- PC mayor de 75 y PN entre 1-5 UF; Sensibilidad 100% Y Especificidad 100%

c) Prueba de detección del virus de Hepatitis C (UMELISA HCV)
Características

- Ensayo inmunoenzimático indirecto
- Fase sólida tiras de ultramicroelisa recubiertas con péptidos sintéticos correspondiente a las regiones del núcleo, regiones no estructurales NS4 y NS5 y una proteína recombinante de la región NS3 del VHC.
- Si la muestra posee anticuerpos específicos se fijarán al antígeno de recubrimiento
- Se añade conjugado Anti IgG humana-Fosfatasa alcalina.
- En caso de reacción positiva el anticuerpo marcado se une al inmunocomplejo previamente formado sobre la fase sólida.

Procedimiento de la prueba de detección del virus de Hepatitis C (UMELISA HCV)

- Utiliza como fase sólida placas de tiras de ultramicroELISA recubiertas con péptidos sintéticos correspondientes a las regiones del núcleo, regiones no estructurales NS4 y NS5 y una proteína recombinante de la región NS3 del VHC.
- Si la muestra tiene anticuerpos específicos se fijarán al antígeno de recubrimiento.
- Se añade el conjugado Anti IgG humana/Fosfatasa Alcalina.
- En caso de reacción positiva este anticuerpo marcado se unirá al complejo previamente formado sobre la fase sólida.
- Se añade el sustrato fluorogénico 4 metilumbeliferil fosfato, este será hidrolizado y la intensidad de la fluorescencia emitida permitirá detectar la presencia de anticuerpos al VHC en la muestra
- Cuidados especiales en la neutralización del conjugado, tomar todas las precauciones, puede contaminarse con suero humano. Leer precauciones del Insert
- Al menos uno de los duplicados del Blanco (B1-B2) debe tener un valor de fluorescencia menor de 10 unidades
- Al menos uno de los dos duplicados del control Positivo (P1-P2) debe tener un valor de fluorescencia entre 60-180 unidades, NC mayor o igual a 0,3; Sensibilidad y Especificidad 100% .

2- Programa materno infantil

a) Prueba de diagnóstico del PKU

UMTEST PKU.

Prueba fluorescente para la cuantificación de fenilalanina (phe) en sangre seca sobre papel de filtro para uso in vitro.

La fenilcetonuria es un trastorno autosómico recesivo que se produce por el déficit completo o casi completo de hidroxilasa de fenilalanina. Esta enfermedad se describió en 1934 por Folling, en la forma completa se presenta fenilalanemia mayor de 1mM (16mgx100ml). La misma cursa con retraso mental y excreción urinaria de ácido fenilpirúvico. La fenilalanina se acumula por bloqueo de la vía catabólica y el organismo recurre a otras vías no ordinarias que dan lugar al ácido fenilpirúvico que finalmente se excreta en la orina.

Muestra

Para el diagnóstico se utiliza la sangre seca tomada del talón por punción y depositada en papel de filtro absorbente. Es enviada al centro de genética de cada municipio y de aquí al laboratorio de inmunoensayo donde se desarrolla el programa en cada provincia.

Son positivos si se cuantifica más de 15 mgxdl. Los positivos son enviados al centro nacional de referencia nutricional para imponer el tratamiento.

Principios y características del ensayo.

Es un ultramicroensayo-fluorescente para la determinación cuantitativa de Fenilalanina (Phe), en sangre seca sobre papel de filtro. Se basa en la reacción de la Phe presente en la muestra con la ninhidrina con condiciones de pH óptimo y temperatura óptima, donde se forma un complejo poco fluorescente, con la adición de iones cobre se amplifica la fluorescencia, aumentando la intensidad, por la previa adición de L-leucil-L-alanina a la mezcla de reacción, en el que la intensidad de la fluorescencia emitida es directamente proporcional a la concentración de Phe en la muestra.

Precauciones

- Manipule los calibradores, el control y las muestras como potencialmente infecciosos. Utilice guantes desechables. Los materiales utilizados deben colocarse en soluciones desinfectantes de hipoclorito de sodio al 5% y esterilizarse en autoclave.
- Considere a los equipos y accesorios que han estado en contacto directo con las muestras como contaminados. Realice la limpieza que se recomienda en los manuales.
- Las muestras de sangre seca colectadas sobre papel de filtro no deben permanecer a temperatura ambiente por más de una semana. Almacenar de 2 a 8 grados durante 4 meses como máximo.

- Antes de comenzar a trabajar verifique que todos los reactivos se encuentran a temperatura ambiente y que el reactivo R2(Ninhidrina) y el R3(L-leucil-L-alanina), una vez preparados según las especificaciones, se encuentran completamente disueltos.
- Verificar que las tiras de reacción se encuentran bien niveladas sobre el soporte.
- Utilice puntas limpias o nuevas para la reconstitución y trabajo con las soluciones y las muestras.
- Garantice el adecuado control de la humedad en todos los pasos de la prueba. Las Placas de reacción con las muestras y reactivos deben mantenerse en las cámaras húmedas para evitar su evaporación ya que esto puede alterar los resultados.
- Verifique periódicamente la exactitud y precisión de las pipetas.
- Cumpla las normas de manipulación de los equipos y verifique su adecuado funcionamiento, tenga especial cuidado con el pipeteo.
- Si utiliza la pipeta ERIZO para transferir los calibradores, controles y muestras, debe lavar profusamente sus puntas para evitar la contaminación.
- Evite la exposición a la luz de los frascos que contienen ninhidrina.
- Evite el contacto de la ninhidrina con los ojos o la piel, el concentrado de cobre puede resultar nocivo por ingestión y provocar irritación en los ojos.
- El juego de reactivos no puede emplearse después de la fecha de vencimiento.
- Los reactivos de lotes diferentes no pueden intercambiarse.

Interpretación y cálculo de los resultados

Los valores de fluorescencia de las muestras de concentración desconocida se interpolan en un gráfico de fluorescencia contra el logaritmo de la concentración de Fenilalanina (Phe) correspondiente a la curva de calibración, obteniéndose los resultados en μmol de Fenilalanina/L de sangre total. Entre el calibrador A y el calibrador B se utiliza una escala lineal-lineal. Este procedimiento es realizado automáticamente por el lector SUMA.

La validación, interpretación e impresión de los resultados es realizada de forma automática por el programa UMTEST PKU.

Teniendo en cuenta los diferentes factores genéticos y ambientales que actúan sobre las poblaciones, la práctica internacional recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

Generalmente se acepta como valor límite $240\mu\text{mol/L}$ de Fenilalanina de sangre total, las muestras que presentan una concentración igual o superior son consideradas como elevadas.

Factor de conversión más usado: $\mu\text{mol/L}=60,54\text{mg/dl}$.

Características específicas del ensayo

Precisión

Se calcula evaluando muestras comprendidas en tres niveles de concentración de Phe: Alto, medio y bajo.

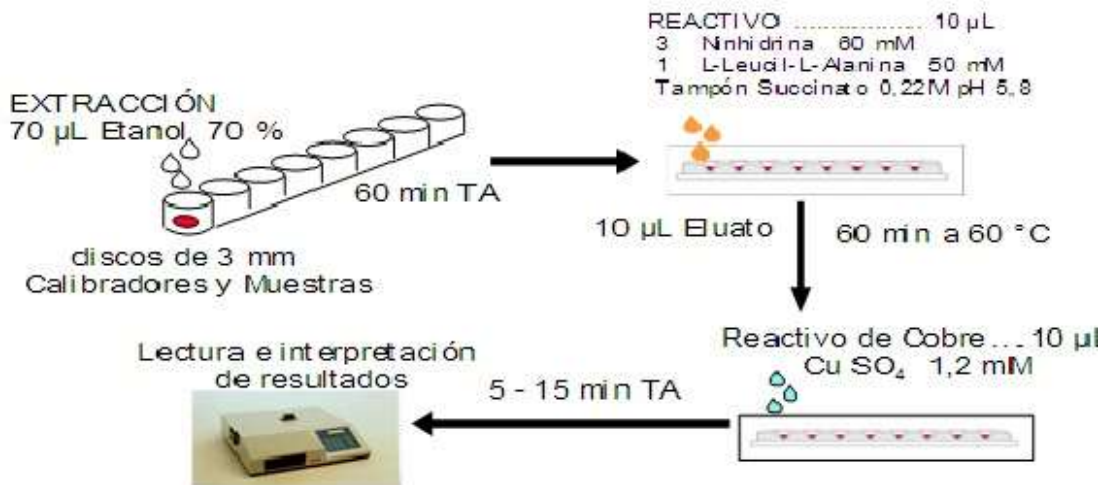
Exactitud

Se realizan diluciones seriadas a muestras de sangre con diferentes concentraciones de Phe antes de que fueran colectadas sobre papel de filtro. Las concentraciones calculadas después de la corrección con el factor de dilución fue de +/- 10 % de la concentración original en la muestra pura.

Detectabilidad

La concentración mínima fue de 50 umol de Fenilalanina/L de sangre total. Se definió como la concentración calculada para una fluorescencia equivalente al calibrador A+ 2 DE.

Figura 1.14. Procedimiento del UMTEST PKU



Tomado de los Manuales de SUMA

b) Examen para la determinación de Gonadotropina Coriónica Humana en suero y orina.

Fundamento

El UMELISA H.C.G utiliza como fase sólida de ultra micro ELISA (10 unidades landas por pocillo) revestidas con anticuerpos monoclonales y policlonales Anti beta HCG. Las muestras se incuban en los pocillos de la tiras y si estas contienen HCG la misma se fija a los anticuerpos del recubrimiento. La realización de un lavado posterior elimina los componentes de la muestra no fijados se adiciona entonces un conjugado anti HCG (cadena alfa y beta) fosfatasa alcalina, el cual

se une a la HCG fijada en la reacción anterior. Un nuevo lavado de las tiras elimina el conjugado en exceso. Al adicionar un sustrato fluorogénico (4-metilumbilferilfosfato) en los pocillos de las tiras, este resultará hidrolizado por la enzima del conjugado y la intensidad de la fluorescencia emitida, será proporcional a la concentración de HCG en la muestra.

Interés Clínico

- 1- El diagnóstico temprano de embarazo: la presencia de HCG en orina es índice de embarazo.
- 2- La evolución de trastornos del embarazo (en orina) : embarazo ectópico y amenaza de aborto espontánea, se diagnostican por una baja concentración de HCG en un periodo determinado de gestación .
- 3- Como marcador tumoral (en suero) se asocia a enfermedades malignas trofoblásticas.
- 4- Marcador de riesgo para el síndrome de Down: cuando los niveles de HCG están elevados.

c) Examen de cuantificación de inmunoglobulina en suero humano

Fundamento

El UMELISA es un ensayo inmuno enzimático heterogéneo tipo sándwich en el cual se utiliza como fase sólida tiras de ultra micro ELISA revestidas previamente con anticuerpos monoclonales anti- IGE. La muestra se incuba en los pocillos de las tiras de reacción fijándose la inmunoglobulina E presente a los anticuerpos de recubrimiento. La realización de un lavado posterior elimina los componentes no fijados, permaneciendo en el pocillo el complejo anticuerpo inmunoglobulina IGE se adiciona entonces un conjugado anti – IGE fosfatasa alcalina el cual se unirá a la inmunoglobulina IGE fijada en la reacción anterior. Un nuevo lavado de las placas eliminará el conjugado del suero en exceso. Al adicionar un sustrato fluorogénico (4- metilumbilferilfosfato) en los pocillos de las tiras este resultará hidrolizado por la enzima del conjugado y la intensidad de la fluorescencia emitida será proporcional a la concentración de inmunoglobulina E presente en la muestra.

Interés Clínico

→ permite el diagnóstico y el estudio de las enfermedades alérgicas ya que su función principal IGE es la de las reacciones alérgicas (identificación de asma intrínseco y extrínseco, shock anafilático- síndrome de Jonson, reacciones alérgicas a las penicilinas, entre otras).

→ Definir la posible causa alérgica de una rinitis o diferenciar una dermatitis atópica de otras enfermedades de la piel.

d) Examen para la determinación cuantitativa de la hormona estimulante de la Tiroide en sangre seca sobre papel de filtro.

Fundamento

El UMELISA TSH neonatal es un ensayo heterogéneo inmunoenzimático tipo sándwich en el cual se utiliza como fase solida placa de tiras con pocillos revestidos previamente con anticuerpos monoclonales anti cadena beta de la TSH lo cual garantiza la especificidad del ensayo , las muestras en los calibradores y el control en marchas de sangre seca se e luyen con un conjugado anti TSH humana (carnero) fosfatasa alcalina. Este aluato se deposita en l0os pocillos de las tiras permitiendo la formación del complejo anticuerpo TSH anticuerpo-enzima, la realización de un lavado posterior elimina los componentes no fijados. Al adicionar un sustrato fluorigenico (4- metilumberilfosfato) en los pocillos de las tiras , este resultar hidrolizado por la enzima del conjugado y la intensidad de la fluorescencia emitida será proporcional a la concentración de TSH presente en la muestra .

Interés Clínico

Diagnóstico del hipotiroidismo congénito en recién nacidos (ausencia anatómica o funcional de la glándula tiroides.

e) Examen de la cuantificación de hormonas estimulantes del tiroides en suero humano.

Fundamento

La hormona estimulante de la tiroides TSH es una hormona glicoproteica con un peso molecular de 28 mil Dalton. Está compuesta de 2 cadenas polipeptídicas que se han denominado alfa y beta. La cadena alfa muestra una gran similitud con la cadena de las otras hormonas hipofisarias de estructura similar (FSH,LH y HCG) mientras que la cadena beta confiere a la hormona su especificidad inmunológica y funcional .

Interés Clínico

- 1- Pesquizaje de hipotiroidismo congénito en recién nacidos.

Nota: estas pruebas son de vital importancia pues se les realizan a niños recién nacidos para determinar a edades tempranas alguna irregularidad o desequilibrio que , de no ser tratado a tiempo pueda traer a ese bebe daños mayores una vez que comience a crecer, es por ello que representan un puntal fundamental del programa materno infantil.

2.2.3.6. Ejemplos de la aplicación de SUMA en el control epidemiológico

- **Virus de Dengue, UMELISA de captura, IgM.**

El Dengue es un antiguo enemigo de la salud de la humanidad que en la década de los 80 del siglo pasado reemergió y aparecieron brotes explosivos en países que hacía años no lo reportaban o inclusive en países que nunca antes lo habían tenido.

En la actualidad es un fenómeno que alcanza a los países tropicales y con magnitud importante en las Américas, esta región ha sido víctima de su forma más grave: el Dengue Hemorrágico (DH) y el Síndrome de Choque por Dengue (SCD).

En 1981 Cuba fue el escenario del más devastador brote de DH y SCD registrado en Las Américas con 344 203 casos de Dengue y DH con 158 defunciones de las cuales 101 fueron niños. En 1989 al 1990 Venezuela sufrió el segundo brote de importancia en la región con 5 990 casos de DH y 70 defunciones.

La participación comunitaria constituye la piedra angular en la prevención del Dengue y el lugar del laboratorio en el diagnóstico sirve de base al diagnóstico individual y la vigilancia epidemiológica.

Complejo Dengue

Existen cuatro serotipos: D1, D2, D3, D4. Que pertenecen a la familia Flavoviridae, género Flavivirus. Estos poseen una molécula de ARN de cadena única, miden aproximadamente 50 nm de diámetro y presentan una envoltura lipídica. La infección del hombre por un serotipo produce inmunidad para toda la vida contra la reinfección con ese serotipo pero protege parcial y temporalmente contra los otros. La circulación simultánea de varios serotipos predispone a la ocurrencia de Dengue Hemorrágico Epidémico.

Presentación del agente

El genoma codifica para tres proteínas estructurales: proteína C de la cápside, una proteína asociada a la membrana llamada M y la proteína E de la envoltura. También codifica para siete proteínas no estructurales con funciones no bien definidas.

Vías de transmisión

El dengue es una enfermedad viral aguda transmitida por mosquitos del género Aedes, fundamentalmente el Aedes aegypti y el Aedes albopictus.

Cuadro clínico

Las infecciones virales por Dengue causan un espectro de enfermedades que varía desde el proceso asintomático a la fiebre indiferenciada o al dengue clásico y de este a la fiebre hemorrágica. Su período de incubación es de 4 a 6 días, Por lo que , la enfermedad clásica se caracteriza por inicio brusco, fiebre alta, cefalea intensa, dolor retrorbital, dolores musculares, dolores articulares, erupción cutánea. Donde el cuadro grave (DH) incluye las hemorragias en la piel (prueba de torniquete positiva, petequias) hemorragias nasales, gingivales, gastrointestinal, hematuria e hipermenorrea. Los análisis de laboratorio clínico demuestran leucopenia, trombocitopenia y hemoconcentración que indica extravasación de plasma y se encuentra siempre inclusive en los casos sin choque a causa de un aumento de la permeabilidad vascular.

Diagnóstico

El diagnóstico puede ser complicado

- Circulación del Dengue y otros flavivirus
- La mayoría de las pruebas serológicas miden anticuerpos
- Dos o más tipos de virus pueden infectar de forma secuencial un huésped
- Alguno de los reactivos no están disponibles comercialmente.
- El tiempo requerido para obtener los resultados del laboratorio es largo.

El diagnostico se hace con el **objetivo de detectar de forma individual** la presencia del virus de la dengue y como **soporte de vigilancia epidemiológica**. Por lo que, el **Diagnóstico individual** permite hacer la confirmación de casos y diagnóstico diferencial; Manejo clínico así como la confirmación de casos FHD . Mientras que el **Soporte a la vigilancia de dengue** sirve para la detección temprana de circulación en áreas nuevas; Estudios de Incidencia después de epidemias y la Caracterización Cepas.

El diagnóstico definitivo de la infección por el virus del Dengue solo puede ser realizado en al laboratorio y depende del aislamiento viral, detección del antígeno viral, detección de genoma (PCR) y la detección de anticuerpos específicos.

Muestra

La efectividad del diagnóstico serológico depende de la calidad de la muestra recibida y del momento de la toma de la muestra. Obviamente que la muestra ideal para estudios virológicos y serológicos es el suero.

Cuidados con la muestra para diagnóstico serológico

Tomar 1ml de la muestra de suero en el 5º día, evitar la hemólisis, ciclos de congelación y descongelación, Conservar y trasladar en frío, observar la correcta identificación, breve información clínica y epidemiológica del paciente: fecha de inicio de los síntomas, fecha de la toma de la muestra (esto permitirá la selección de la muestra, su aceptación para la correcta interpretación de los resultados).

Para el diagnóstico serológico de Dengue se han utilizado las siguientes pruebas

- ELISA - IgM de captura y IgG indirecto
- Inhibición Hemaglutinación
- Fijación de complemento
- Neutralización

En Cuba el Centro de Inmunoensayo ha diseñado un estuche diagnóstico para la detección de anticuerpos IgM al virus del Dengue: UMELISA heterogéneo en su variante de captura válido para detectar anticuerpos IgM contra los cuatro serotipos y recomendable para la vigilancia seroepidemiológica y diagnóstico de casos clínicamente sospechosos en la infección por cualquier serotipo del virus del Dengue.

IgM

- Es la protagonista o blanco del diagnóstico
- Es la principal inmunoglobulina producida tempranamente en la respuesta inmune primaria
- Es importante en la defensa ante las infecciones virales.
- Es pentavalente, aglutinadora por excelencia.
- La detección de anticuerpos IgM específicos contra el virus dengue indica infección activa o reciente.
- Se desarrolla tempranamente y de forma general se puede detectar a partir del quinto día de comienzo de los síntomas y como promedio disminuyen a partir de los 30 días, aunque pueden detectarse hasta los 60 días o más, donde se puede tener 10% falsos positivos y 1.7% falsos negativos

Fundamento del ensayo

El UMELISA DENGUE IgM PLUS es un ensayo inmunoenzimático heterogéneo en su variante captura que emplea las ventajas de la reacción de alta afinidad entre la Estreptavidina y la Biotina.

Se utilizan como fase sólida tiras de ultramicroELISA(10 microlitros por pocillo) revestidas con anti IgM humana. Las muestras se incuban en los pocillos de las

tiras y los anticuerpos en su superficie capturan la IgM presente en el suero. Se añade el antígeno de dengue (mezcla de los 4 serotipos del virus) que se unirá a la IgM específica capturada en el paso anterior. Se añaden anticuerpos monoclonales biotilados específicos al virus dengue (Anticuerpos Biotilados), que se unirán al complejo formado sobre la fase sólida. Se aplica el conjugado Estreptavidina /Fosfatasa Alcalina (F.A.), que se unirá al complejo formado anteriormente en casa de reacción positiva. Por último, se adiciona el sustrato fluorogénico (4-Metilumbeliferil fosfato), que será hidrolizado y la intensidad de la fluorescencia emitida permitirá detectar en la muestra la presencia de anticuerpos IgM específicos al virus del dengue.

PCR: Diagnóstico; Vigilancia; Epidemiología Molecular; Estudios etiopatogenia; Drogas antivirales, vacunas.

Ventajas del PCR: Rápido; Alta sensibilidad; Alta Especificidad; Contaminación?

Para flavivirus se utilizara como muestra el suero, células infectadas ; larvas infectadas; pools mosquitos y órganos de fallecidos.

2.2.3.7. Precauciones en la utilización de la tecnología SUMA

- Para la lectura en fluorescencia se debe colocar el filtro secundario de fluorescencia.
- Para la medición en absorbancia se debe retirar el filtro secundario de fluorescencia y colocar el filtro de interferencia adecuado.
- La operación DEL para borrar datos de lectura debe ser utilizada cuidadosamente. Una vez borrados los datos son irrecuperables.
- Revise con la opción PROG. Los valores para el cálculo de los resultados de las técnicas cualitativas.

2.2.3.8. Recomendaciones para lograr mejores resultados.

- Se recomienda no colocar el equipo en planos inclinados, o lugares **donde** esté sometido a vibraciones mecánicas.
- No ubicarlo cerca de las paredes u objetos que dificulten su ventilación. Tampoco sobre lugares sometidos al polvo excesivo.
- No colocar el equipo cerca de fuentes de calor tales como calefacción o la luz solar.
- No colocar objetos pesados sobre el equipo.

Los datos almacenados en memoria pueden perderse en caso de permanecer desconectado de la corriente el equipo por más de 72 horas.

2.2.3.9. Perspectivas de la Tecnología SUMA

El SUMA, por ser un UMELISA originario de Cuba y usado hasta la fecha solamente en Cuba, Brasil, Venezuela, Argentina, México, Colombia y China se prospera que sea expandido por mas diversificados países con vista su aplicación en las diversas esferas diagnosticas, pesquisaje, preventivas, seguimientos e control evolutivo de múltiples enfermedades. Además se está tomando en evidencia en la investigación de enfermedades cancerígenas.

2.2.4. Ejercicios de Comprobación del Capítulo 2. Subtema 2.2

- 1- Complete los espacios en blanco atendiendo a la determinación de Glicemia,
 - a) Cuando separamos el suero del coagulo de inmediato evitamos la _____.
 - b) La hemólisis trae como consecuencia un resultado _____.
 - c) Para la determinación de glucosa en sangre se utiliza el método de Rapi-glucotest (glucosa –oxidasa y peroxidasa)
 - d) La prueba de tolerancia a la glucosa (PTG) se utiliza como diagnóstico de certeza de la diabetes mellitus
 - e) Cuando las muestras tienen un color anormal se debe montar un _____.

- 2- Sobre la determinación de Glucosa responda Falso(F) o Verdadero(V) según corresponda. Justifique lo falso.
 - a) ___ Si la muestra no se va a procesar de inmediato debe separar el suero del coagulo.
 - b) ___ La determinación de glucosa por el método de glucosa oxidasa tiene una baja especificidad.
 - c) ___ Los resultados se expresan en micromol / L
 - d) ___ Para la determinación de Glicemia Postpandrial el paciente tiene que estar en ayunas.
 - e) ___ Los valores por debajo de 4,22 se consideran como Hipoglicemia.

- 3- Complete los espacios en blanco
 - a) La formación de la urea tiene lugar en el _____.
 - b) La eliminación renal de amoniaco tiene lugar en forma _____.
 - c) El compuesto nitrogenado más utilizado para medir función renal es: _____

- d) En las enfermedades reumáticas el compuesto nitrogenado que sus concentraciones se ven aumentadas es el _____
- e) La reacción de Jaffé se utiliza la cuantificación de _____.
- 4- Indique la razón por la cual se utiliza como adicional la enzima α -amilasa en el procedimiento de la técnica de PAS
- 5- ¿Qué es un inmunoensayo?
- 6- ¿Qué se entiende por enzimoimmunoensayo (EIE)?
- 7- ¿Cuáles son las propiedades de las enzimas que permiten su uso como herramientas de trabajo?
- 8- ¿Como se clasifican los enzimoimmunoensayos?
- 9- Ponga en ejemplos de ensayos EIE homogéneos y heterogéneos en el Laboratorio SUMA.

Bibliografía consultada

- Cardellá Rosales L, Hernández Fernández R, Upmann Pnce de León C, Vicedo Tomey A, Pérez Díaz A, Zierra Figueredo C, et-al. Bioquímica Médica. Tomos I-IV. La Habana-Cuba: Editorial Ciencias Médicas; 1999.
- Castro Torres M.A, Casas Vaquero H, Calzado Serrano L, Olivera Suárez M, Pérez Llauger S, Neobis Hernández F. Manual de procedimiento de enfermería. La Habana: editorial ciencias medicas; 2002.
- Centro de Estudio de Medio Ambiente y Recursos Naturales (CEMARNA). Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible. Pinar de Río. Universidad "Hermanos Saiz Montes de Oca"; 2011
- Colectivo autores. Diccionario Terminológico de Ciencias Médicas: Editorial científico Técnico; 2009.
- Colectivo de autores. Tecnología SUMA- Aplicaciones y uso. Ciudad de la Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2007.
- Cuba. Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente. Lineamientos de Seguridad Biológica para la construcción de policlínicos y hospitales. Centro Nacional de Seguridad Biológica. Ciudad de la Habana. Oficina de Regulación Ambiental y Seguridad Nuclear; 2007
- Diccionario de Medicina. ``Océano Mosby``. Edición 22-23. Barcelona.
- Empresa de Producción de biológicos. Diagnosticadores para Química Clínica y Microbiología. Habana; 2008
- Folleto de procedimientos analíticos- sección hemoquímica. Dpto del Lab del Hospital Abel Santa Maria de Pinar del Rio- Cuba; 2009
- Govidi I. Química Inorgánica y Analítica. Rusia; 1989
- Guardián López M, Kontorovsky Artola I, Alvarado Abaunza Z, Gonzalez Mairena A. Manual de procedimientos de laboratorio en Bioquímica Clínica y control de calidad. Editorial Salud Publica: Managua-Nicaragua; 2004
- Guyton M.D, Arthur C. Tratado de Fisiología Médica. Decima ed. Ciudad de la Habana: Ciencias Médicas; 2008.
- Junqueira P. Histología y sus métodos de estudio. Cuba; 2008
- León Oquendo M. Bioquímica Básica para las actividades Físicas. Ciudad de la habana: Editorial Deportes; 2004.
- Llanio N, Raimundo F, Perdomo G. G. Propedéutica Clínica y Semiología Médica. Ciudad de la Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2008.
- Llop Hernandez A, Valdez-Dapena Vivianco M, Zuazo Silva L.J. Microbiología y Paracitología Médica. Tomo I-III. La Habana: Editorial Ciencias Medicas; 2001.
- Luque Cabrera J, Herráez Sánchez A. Biología Molecular e Ingeniería Genética. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2006.

- Macfaddin Jean F. Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ra edición, tomo I y II. Ciudad de la Habana: Editorial Ciencias Medicas; 2006
- Manual de uso de los diagnosticadores. Empresa de producción de biológicos "Carlos J. Finlay. La Habana; 2008
- Matarama Peñate M, Llanio Navarro R, Muñiz Iglesias P, Quintana Setien C, Hernández Zúñiga R, Vicente Peña E, et al. Medicina Interna: Diagnóstico y tratamiento. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2005.
- Microsoft ® Encarta ® 2009. © 1993-2008 Microsoft Corporation. Reservados todos los derechos
- Murray Patrick R, Rosenthal Ken S, Pfauer Michael A. Microbiología Médica. Edición en español de la 5ta ed en inglés. Madrid- España; 2007
- Oficina Nacional de Normalización. NC 530/09. Desechos sólidos-Manejo de desechos sólidos de instituciones de salud-Requisitos sanitarios y ambientales. Cuba; 2009.
- OMS/ONUSIDA /UNICEF. Hacia el acceso universal: expansión de las intervenciones prioritarias contra el VIH/SIDA en el sector de la salud. Informe 2010 sobre los progresos realizados. Ginebra: OMS/ONUSIDA/UNICEF; 2010. Disponible en: <http://www.who.int/hiv/pub/2010progressreport/es/index.html>. Consultado el 10 de agosto de 2011
- Perilla M.J, Ajello G, Elliott J, Facklam R, Karapps J, Popovic T, Wells J. Manual de Laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos bacterianos de importancia para la salud pública en el mundo en desarrollo. Estados Unidos de América(inglés); 2004
- Roca Goderich R, Smith V, Paz presilla E, Losada Gomez J, Serret Rodriguez B, Llamas Sierra N, et al. Temas de Medicina Interna. 4^{ta} Ed. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2002
- Rosell Puig W, Dovale Borjas C, Alvarez Torres I. Morfología Humana. Tomo II. La Habana: editorial Ciencias Medicas; 2002
- Sohn D.I, Henri B.J. Diagnostico Clínico por el laboratorio. Cuba.
- Suardiaz Perreras J. H, Cruz Rodríguez C. L, Colina Rodríguez A, Alerm González A, Alfonso Valdés M. E, Alonso Biosca M. E, et al. Laboratorio Clínico. Ciudad de la Habana: Editorial Ciencias Medicas; 2004
- Torres Delgado J. A, Rubén Quesada M, Bayarre Veá H, Garriga Sarria E. P, Pria Borrás M.C, Gran Álvarez M et al. informática médica – bioestadística. Ciudad de la Habana: Editorial Ciencias Medicas; 2004

Anexo 1.

Respuesta a los ejercicios de los capítulos

Respuesta de los ejercicios de Comprobación del Capítulo 1

Respuesta de la pregunta 1

- a) F -bajo
- b) F-catalizan la transformación del sustrato en producto.
- c) F- con la etapa de catálisis.
- d) V
- e) V
- f) V

Respuesta de la pregunta 2

- a) V
- b) V
- c) F porque los grupos fijadores son cadenas laterales de aminoácidos
- d) V
- e) F - porque los mecanismos de modulación covalente están asociados con la acción de otras enzimas que permiten la unión covalente o separación de un resto de ácidofosfórico o de adenilo
 - Los que están asociados con el sustrato o el producto de la reacción son los mecanismos alostéricos
- f) F porque entre las propiedades de la enzima esta la de tener especificidad de acción lo que hace que solo pueda llevar a cabo sobre el sustrato una transformación dígase descarboxilación, deshidrogenación, carboxilación, transaminación entre otras

Respuesta de la pregunta 3

- a. Ribozama
- b. Hidrolasas
- c. Velocidad
- d. Reacción
- e. Sitio de catálisis o centro activo
- f. Marcadores moleculares.

Respuesta de la pregunta 4

R/ El uso de los biocatalizadores en el laboratorio tiene gran importancia pues son económicos por su fácil adquisición, además al no ser contaminantes son específicos, rápidos y eficientes garantizándose así la confiabilidad de los resultados.

Respuesta de la pregunta 5

- a. Transferasa
- b. Energía de activación
- c. Sitio de catálisis
- d. Especificidad
- e. Proteica

Respuesta de la pregunta 6

a) R/

Acción catalítica que consiste en la capacidad de acelerar la velocidad de la reacción, sin consumirse

Especificidad de sustrato solo se une a un tipo de sustrato y especificidad de acción: solo realiza un tipo de acción.

Eficiencia pues intervienen en las reacciones químicas en cantidades muy pequeñas modificando la velocidad de las reacciones reversibles sin alterar el equilibrio final.

b) R/ Los cofactores pueden ser metaloenzima si está unido a un ion metálico y coenzima si está unido a una vitamina

c) R/ El conocimiento de los factores que pueden afectar la estructura, propiedad y función de la enzima tienen gran importancia para un bioanalista pues ello permite que se tengan en cuenta durante la realización de la técnica o método para evitar procedimientos no adecuados y obtener por ende resultados erróneos.

Respuesta de la pregunta 7

- a) Catalítica
- b) Abzimas
- c) Isomerasas
- d) La especificidad de sustrato
- e) Enzima-Sustrato
- f) Zimógenos

Respuesta de la pregunta 8

- a) V
- b) F - Los grupos de ambientación no permite la entrada de agua (H₂O) al centro activo
- c) F- Los grupos de catálisis catalizan la transformación del sustrato en producto
- d) V
- e) V
- f) V
- g) F - En la etapa de transformación se lleva a cabo la catálisis o en la etapa de reconocimiento se forma el complejo ES
- h) F - Los grupos ambientación son cadenas laterales de aminoácidos apolares
- i) V
- j) F - Los grupos catalíticos están relacionados con la etapa de transformación

Respuesta de la pregunta 9

- a) F- 7,4, por ser el pH fisiológico.
- b) V.
- c) V
- d) F- la especificidad.
- e) F- incrementa directa y proporcionalmente

Respuesta de la pregunta 10

- a) F – Porqué estos se unen a la enzima por el sitio alostérico
- b) V
- c) V
- d) F – Porqué estos son generalmente iones inorgánicos que son requeridos o al menos estimulan, la actividad catalítica de una enzima
- e) V
- f) F- Porqué un aumento de temperatura de la reacción incide negativamente en la velocidad de la reacción pues trae consigo la alteración de la estructura tridimensional de la enzima que tiene naturaleza proteica
- g) F– Porqué estas presentan diferentes valores de punto isoeléctricos siendo esta la base de su detección y separación mediante la electroforesis en gel
- h) V
- i) F- Porqué al ser el ATP producto el ADP se convierte en un activador (efector positivo) de la reacción.

- j) F– porque la activación es irreversible, lo que las enzimas proteolíticas pueden inactivarse nuevamente mediante la acción de proteínas inhibidoras.
- k) V
- l) V

Respuesta de los ejercicios de Comprobación del Capítulo 2. Subtema 2.1

Respuesta de la pregunta 1

R/ Porque la enzima amilasa alcanza su niveles séricos más elevados en un paciente con pancreatitis aguda entre las 24 y 30 horas disminuyendo hasta llegar a los niveles normales entre las 24 y 48 horas siguientes por lo que de no realizar el análisis entre las 12 y 30 horas, el diagnóstico quizás no coincida con la realidad mientras que los niveles de la enzima amilasa se mantiene aumentados en orina de 3 a 5 días luego de haber alcanzado los niveles séricos normales la enzima.

Respuesta de la pregunta 2

R/ Normalmente la enzima amilasa es producida por el páncreas y las trompas de falopio alcanzando valores séricos menores a las 89 U/L. Cuando estos niveles séricos aumentan quiere decir que el órgano esta afectado

Respuesta de la pregunta 3

R/ Para el diagnóstico de la hepatitis se deben tener en cuenta los niveles séricos de la TGO/ASAT y TGP/ ALAT pues la TGP se encuentra en citoplasma del hepatocito(enzima unicular) por lo que su incremento sérico determina la evidencia de la afección del tejido hepático mientras que la TGO además de ser una enzima cardiaca se encuentra también en el citoplasma y en la mitocondria del hepatocito (enzima binocular) por lo que su incremento sérico indica la profundidad de l daño hepático.

Respuesta de la pregunta 4

R/

Enzimas	Localización	Patología
Creatina quinasa CK-MB	-músculo cardíaco	Cardiopatías, en inflamaciones, enfermedades musculares degenerativas, shock,

		hipotiroidismo, psicosis aguda y en puerperio
Láctico deshidrogenasa	-citoplasma -músculo esquelético, hígado, cerebro, corazón, riñón, páncreas, pulmones y en los eritrocitos	- infarto, necrosis hepática, necrosis tubular renal, pielonefritis.
TGO	-mitocondrias y citoplasma -hígado y corazón	-infarto agudo de miocardio -afecciones hepáticas

Respuesta de la pregunta 5

- a) V
- b) F- pequeñas
- c) V
- d) V
- e) F - unicular
- f) F- tejidos renales

Respuesta de la pregunta 6

- a) 4
- b) 3
- c) 1
- d) 2
- e) 2
- f) 4
- g) 1
- h) 2
- i) —

Respuesta de la pregunta 7

- a) — X —
- b) X — —

Respuesta de la pregunta 8

4

—

1

2

5

3

7

1

Respuesta de la pregunta 9

a) iones de hierro, fosfatos, ácidos nucleídos, células, lípidos, glúcidos, glicoproteínas, enzimas y etc.

b) Dichos métodos se basan en **reacciones químicas específicas o en la interacción macromolecular de alta afinidad.**

Respuesta de la pregunta 10

R/ Los métodos para la localización enzimática se fundamentan en la producción de un precipitado intensamente teñido o electrodensado en el lugar de la actividad de la enzima con el empleo de la microscopia óptica o electrónica.

- a) por ejemplo la **Fosfatasa ácida**: que se halla en los riñones, en el suero, en el semen y su mayor concentración se halla en la próstata. Se eleva en el cáncer de próstata y en los traumatismos, las **deshidrogenasas**: importantes en el metabolismo celular permitiendo visualizar la actividad de la succinodeshidrogenasa del ciclo de Krebs y la **peróxidasa**: enzima que normalmente se encuentra en los tejidos humanos principalmente en la células del sistema hematopoyético, estimula la oxidación de ciertos compuestos por el peróxido de hidrogeno.

Respuesta de la pregunta 11

R/ La técnica más utilizada en los métodos histoquímicos es la de **3-3''diaminoazobencídica (DAB)** donde se produce la transferencia de iones de hidrógeno al peróxido de hidrógeno formándose moléculas de agua, por si tratar de una enzima extremadamente activa en un corto intervalo de tiempo se producen cantidades apreciables de precipitado insoluble. Por tanto, con este método pueden localizarse las estructuras con actividad peroxidásica tanto al microscopio óptico o electrónico.

Respuesta de la pregunta 12

R/ La histoquímica enzimática se basa en la determinación de enzimas tisulares mediante reacciones químicas de oxidación-reducción a diferencia de la inmunohistoquímica enzimática que se basa en la reacción antígeno-anticuerpo valiéndose de la enzima (peroxidasa) para el marcaje de los anticuerpos mediante la utilización de sustratos y cromógenos que dan lugar a productos coloreados insolubles, que forman un precipitado en el lugar en el que se encuentra el anticuerpo.

Respuesta de la pregunta 13

R/ Una vez identificado el género de estafilococcus de acuerdo a las características de las colonias del medio de cultivo previo, se realizara la prueba bioquímica de la coagulasa para establecerse la patogenicidad de esta especie bacteriana, pues el estafilo coagulasa positiva es patógena en cualquier localización anatómica, mientras que el estafilo coagulasa negativa solo es patógena en líquidos corporales naturalmente estériles, visto que en ello no hay microbiota indígena.

Respuesta de la pregunta 14

R/ Los dos procedimientos que anteceden a la prueba de coagulasa en las investigaciones bacteriológicas son la coloración de Gram y el respectivo cultivo, puesto que son cocos Gram positivo, anaerobios facultativos.

Respuesta de la pregunta 15

R/ Se ha demostrado que la pared bacteriana es la base de la reacción diferencial frente a coloración de gran, por lo que las floras teñidas de azul-violeta empleando este método son gran (+) debido a que estas poseen en su pared grandes cantidades de ácido teicoico que tiene mayor afinidad con colorantes de naturaleza básica (complejo violeta+lugol) es el caso de los estafilococos, mientras que las teñidas de rojo son Gram (-) por poseer grandes cantidades de

lipopolisacáridos en su pared teniendo afinidad con colorantes de naturaleza ácida (safranina); Además de que las colonias del medio puro deben ser células pequeñas, esféricas y inmóviles.

Respuesta de la pregunta 16

R/ La catalasa es una prueba de la bioquímica bacteriana que nos permite diferenciar el género *Staphylococcus* del *Streptococcus*, visto que los *Streptococcus* son bacterias fermentadoras de diversos glúcidos produciendo el ácido láctico, es decir que son catalasa positiva, mientras que los *Estafilos* no son fermentadoras lo que les hace catalasa negativa.

Respuesta de la pregunta 17

R/ Será necesario utilizar la prueba de Ureasa cuando en el cultivo hay un crecimiento sospechoso de *Proteus*, por lo que es un examen aplicable a bacterias Gram (-), pero solamente el *Proteus* es exclusivamente Ureasa (+).

Respuesta de la pregunta 18

R/ La prueba de la oxidasa se utiliza para identificar todas las especies de neiserias y para distinguir los miembros de la familia *Pseudomonadaceae* de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

Respuesta de los ejercicios de Comprobación del Capítulo 2. Subtema 2.2

Respuesta de la pregunta 1

- a) Glucólisis
- b) Falso aumentado
- c) Glucosa Oxidasa.
- d) Diabetes Mellitus.
- e) Blanco Muestra.

Respuesta de la pregunta 2

- a) \checkmark
- b) \bar{E} alta especificidad.
- c) \bar{E} mmol/L
- d) \checkmark
- e) \checkmark

Respuesta de la pregunta 3

- a) Hígado
- b) Cloruro de amonio.
- c) Creatinina.
- d) Ácido úrico.
- e) Creatinina

Respuesta de la pregunta 4

R/ La enzima amilasa se adiciona en la técnica de PAS como preparación de control por su especificidad por el glucógeno ya que el PAS(ácido periódico de Schiff) puede teñir otras sustancias además del glucógeno.

Respuesta de la pregunta 5

R/ Es un ensayo basado en la reacción antígeno – anticuerpo.

Respuesta de la pregunta 6

R/ Son inmunoensayo que para la detección o cuantificación de la reacción Antígeno- Anticuerpo requiere de una enzima.

Respuesta de la pregunta 7

R/ Por su.....

- Su gran especificidad y versatilidad.
- Estabilidad en condiciones de almacenamiento y en la realización del análisis.
- Formación de conjugados estables.
- Actividad detectable fácilmente.
- Gran cantidad de sustratos disponibles.

Respuesta de la pregunta 8

R/ Se clasifican como homogéneos y heterógamos:

- Homogéneos. La reacción solo ocurre en una sola fase (fase líquida).
- Heterogéneos. La reacción ocurre en dos fases (fase sólida –fase líquida)

Respuesta de la pregunta 9

R/ Ejemplos de ensayos EIE homogéneos y heterogéneos en el Laboratorio SUMA.

- Homogéneos. Determinación de Digoxina. Determinación de IgE y IgM.
- Heterogéneos Determinación del Ag de Superficie de la Hepatitis B, Determinación de Anticuerpos contra el Virus del Inmunodeficiencia Adquirida serotipos I y II, Determinación de Anticuerpos contra el virus de la HCV