

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

E.A.P. DE TECNOLOGIA MEDICA

**Estandarización de la colección de sangre sobre papel
filtro y su tratamiento para la determinación de glucosa**

TESIS :

para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología Médica en el
área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

AUTOR :

Jefferson Joel Quije Jáuregui
Ivonne Patricia Carranza Champac

ASESOR :

Miguel Hernán Sandoval Vegas

Lima- Perú

2012

Dedicada:

A nuestros padres, por creer en nosotros y porque gracias a ellos, hoy podemos ver alcanzada nuestra meta.

A Dios, por ser responsable de todo en nuestras vidas.

A mi hermano Fernando, mi adorado hijo Luis Alonzo y a la memoria de mi abuela Yolanda.

-Ivonne Carranza-

A mi madre Jenny Jáuregui, mi mamita Mercedes Ugaz y la memoria de mi nana Justina Herrera.

-Jefferson Aquije-

Agradecemos:

Al Lic. Miguel Hernán Sandoval Vegas por su constante ayuda, apoyo y paciencia para hacer posible la realización de esta tesis.

A la Mg. Silvia Suárez Cunza, directora del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición “Alberto Guzmán Barrón” – Facultad de Medicina – UNMSM, por permitirnos desarrollar la tesis en el Centro de Investigación.

A nuestros padres, que de manera incondicional nos apoyan y nos dan fuerzas necesarias para seguir adelante.

ABREVIATURAS

ADN	:	Ácido Desoxiribonucleico.
DM	:	Diabetes mellitus.
ATP	:	Adenosina Trifosfato.
NADH	:	Dinucleotido de nicotinamida adenina reducido.
NAD⁺	:	Dinucleótido de nicotinamida adenina.
TCA	:	Ácido Tricloroacético.
Acetil CoA	:	Acetil Coenzima A.
ADA	:	American Diabetes Association.
OMS	:	Organización Mundial de la Salud.
ICAs	:	Anticuerpos anti islotes.
Anti-GADs	:	Anticuerpos antiglutamato decarboxilasa.
HLA	:	Antígeno leucocitario humano.
EDTA	:	Ácido etilendiaminotetraacético
CV	:	Coefficiente de variación.
DS	:	Desviación Estándar.

INDICE

I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCION Y OBJETIVOS.....	3
2.1. INTRODUCCION	3
2.2. OBJETIVOS	18
2.2.1. OBJETIVO GENERAL	18
2.2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	18
III. METODOS.....	19
3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN	19
3.2. DISEÑO	19
3.3. POBLACION Y MUESTRA	19
3.4. VARIABLES	20
3.4.1 INDICADORES	20
3.5. TECNICAS E INSTRUMENTOS	21
3.5.1. TECNICAS	21
3.5.1.1. Precipitación de proteínas por TCA	21
3.5.1.2. Determinación de glucosa por método enzimático	21
3.5.2. EQUIPOS Y MATERIALES	23

3.5.2.1. Equipos e instrumentos	23
3.5.2.2. Materiales y reactivos	24
3.6. PLAN DE PROCEDIMIENTOS Y ANALISIS DE DATOS	25
3.6.1. PLAN DE PROCEDIMIENTOS	25
3.6.1.1. Estandarización del tipo de papel filtro, tiempo de secado y volumen de muestra sanguínea	25
3.6.1.2. Estandarización de la concentración y volumen de TCA	26
3.6.1.3. Estandarización del volumen de sangre y TCA 10% para el desproteínizado	27
3.6.1.4. Efectos de la agitación en la desproteínización	28
3.6.1.5. Estandarización de la temperatura en la desproteínización	28
3.6.1.6. Efecto de la centrifugación en la desproteínización	29
3.6.1.7. Determinación de la linealidad del método de colección de sangre	30
3.6.1.8. Comparación de métodos y estimación del factor de corrección	31
3.6.2. ANALISIS DE DATOS	31
3.7. CONSIDERACIONES ETICAS	35

IV. RESULTADOS.....	36
V. DISCUSIONES.....	55
VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	62
6.1. CONCLUSIONES	62
6.2. RECOMENDACIONES	63
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	64
VIII. ANEXOS.....	70
ANEXO A: TABLA CONSUMO DE GLUCOSA	70
ANEXO B: CURVA DE CONSUMO DE GLUCOSA	71
ANEXO C: FORMATO DE ENTREGA DE RESULTADOS	72

LISTA DE TABLAS

TABLA I:	ESTANDARIZACION DE TIEMPO DE SECADO Y AREA DEL PAPEL FILTRO	40
TABLA II:	ESTANDARIZACION DEL TIEMPO DE SECADO (MEDIA)	41
TABLA III:	PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA REACCION DE COLOR, POR TCA AL 20%	42
TABLA IV:	PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA REACCION DE COLOR, POR TCA AL 10%	43
TABLA V:	ESTANDARIZACION DEL VOLUMEN DE SANGRE, TCA 10% Y DEL DESPROTEINIZADO	44
TABLA VI:	EFFECTOS DE LA AGITACION EN LA DESPROTEINIZACION	45
TABLA VII:	ESTANDARIZACION DE LA TEMPERATURA EN LA DESPROTEINIZACION	46
TABLA VIII:	EFFECTO DE LA CENTRIFUGACION EN LA DESPROTEINIZACION	47
TABLA IX:	DETERMINACION DE LA LINEALIDAD	48
TABLA X:	COMPARACIÓN DEL MÉTODO DE COLECCIÓN	

EN PAPEL CON SUERO FRESCO PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA.	50
TABLA XI: TIEMPO DE VIDA MEDIA DEL ANALITO SOBRE EL PAPEL FILTRO (HORAS)	52
TABLA XII: TIEMPO DE VIDA MEDIA DEL ANALITO TRATADO CON TCA AL 10% (DIAS)	53

LISTA DE GRAFICOS Y FIGURAS

GRAFICO 1: DETERMINACIÓN DE LA LINEALIDAD DEL MÉTODO DE COLECCIÓN DE SANGRE SOBRE PAPEL FILTRO	49
GRAFICO 2: CORRELACIÓN ENTRE CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA EN MUESTRA SANGUÍNEA Y PAPEL FILTRO	51
FIGURA 1: FLUJOGRAMA DE TRABAJO	54

I. RESUMEN

En la sangre, los hematíes por su metabolismo consumen la glucosa plasmática o sérica, generando inexactitud en la glicemia por el tiempo que transcurre desde la toma de muestra hasta su procesamiento. **El objetivo** del estudio fue estandarizar la colección de sangre sobre papel filtro y su tratamiento para la determinación de glucosa. **Materiales y métodos:** a partir de muestras de voluntarios se determinó el área del papel milimetrado, volumen de colección, tiempo de secado, concentración y volumen de desproteinizante, agitación, temperatura y centrifugación, para posteriormente estandarizar el volumen de desproteinado mediante el porcentaje de inhibición en el método enzimático de glucosa-oxidasa. **Resultados:** el papel adecuado fue Whatman[®] n°3, en una área de 100mm², la cantidad de sangre de 20uL, el tiempo de secado 16 min. El desproteinado con TCA al 10% con 200uL, sin agitación, centrifugación ni baño de hielo. El porcentaje de inhibición fue 2.49% que se corrige con el factor de 1,075. **Conclusión:** el método de colección de sangre en papel de filtro y su tratamiento con TCA para la determinación de glucosa es útil y válido con un r de 0,951.

I. ABSTRACT

In the blood, red blood cells for its metabolism consume the glucose of plasma or serum, generating inaccurate by the time spent from sample collection to processing. **The objective** was to standardize blood collection on filter paper and its treatment for glucose determination. **Material and methods:** From samples of volunteers we determined the area of graph paper, collection volume, drying time, concentration and volume of deproteinizing, agitation, temperature and centrifugation, and subsequently standardize the volume of deproteinized by the percentage of inhibition in the enzymatic method of glucose oxidase. **Results:** The appropriate paper was Whatman No 3, in an area of 100 mm², the amount of blood of 20uL, the drying time 16 min. The deproteinized with 10% TCA with 200uL, without stirring, centrifugation or ice bath. The percentage of inhibition was 2.49% which is corrected by the factor of 1.075. **Conclusion:** The methods of blood collection on filter paper and treated with TCA for glucose determination is useful and valid with an r of 0.951.

II. INTRODUCCION Y OBJETIVOS

2.1. INTRODUCCION

El uso del papel filtro para el estudio de diferentes factores biológicos en gotas de sangre seca obtenidos mediante punción digital o del talón fue descrito en Alemania en el año 1913 por Bang (1), en estudios posteriores este concepto fue utilizado para la detección de enfermedades metabólicas en población de recién nacidos, describiéndose en primer lugar la detección de fenilcetonuria en Escocia por Guthrie y Susie en el año 1963 mediante la utilización de la tarjeta de Guthrie con muestras de bebés de dos hasta nueve días de edad (2) e hipotiroidismo congénito. (3)

Hoy en día, la utilización del papel filtro como medio colector de sangre junto con el avance tecnológico nos permite la investigación de muchas características de las manchas de sangre tales como, metabolitos (4, 5, 6), hormonas (7, 8), drogas (9) hasta ADN (10), siendo muchos de estos métodos muy caros y de difícil acceso para la población.

El papel filtro es un papel o material poroso que se utiliza como tamiz o filtro para la retención de partículas, el papel filtro de celulosa se usa en aplicaciones generales de filtración con retención de partículas tan baja como 2,5 μm ., generalmente utilizado en métodos analíticos cualitativos.

Existen diferentes tipos de filtros de papel cada uno con diferente grado de pureza, dureza y resistencia química con una amplia combinación de retención y velocidad de flujo que se adaptan a todas las aplicaciones en el laboratorio (11):

- Grado 1: 11 μm ; el filtro de papel más usado para aplicaciones de retención y velocidad de flujo medio. Se usa para la separación analítica cualitativa de precipitados como el sulfato de plomo, oxalato de calcio y carbonato cálcico.

- Grado 2: 8 μm ; más retentivo y absorbente que el grado 1 pero con tiempo de filtración más lento. Se utiliza en la retención de nutrientes del suelo para el crecimiento de plantas, además de ser apto para el control de contaminantes específicos y análisis de suelos.

- Grado 3: 6 μm ; tiene el doble de grosor que el grado 1 con mayor capacidad de retención de partículas finas y de saturación. Su adsorbancia es útil cuando el papel se usa para transportar muestras.
- Grado 4: 20-25 μm ; muy rápido y con gran capacidad retentiva para precipitados gelatinosos como el hidróxido de hierro y el hidróxido de aluminio. Muy práctico como filtro rápido en rutinas de limpieza de fluidos biológicos o extractos orgánicos.
- Grado 5: 2,5 μm ; el grado máximo en filtración de partículas finas de nuestro rango cualitativo. Este papel de flujo lento retiene los precipitados finos típicos en los análisis químicos.

Uno de los analitos más importantes de interés clínico es la glucosa, ya que sirve de base para el diagnóstico de Diabetes mellitus (DM) (12), una de las enfermedades crónicas consideradas actualmente como problema de Salud Pública (13, 14) con una prevalencia de entre 2 y 5% en la población mundial (13) con tendencia a incrementar un 35% para el año 2025 (14) y de 1 a 8% en la población general peruana(15), con una gran demanda de análisis diagnósticos de la enfermedad y controles de la misma (16).

La glucosa químicamente es una aldohexosa perteneciente a la clase de los carbohidratos que posee dos enantiómeros cuya forma aldehído está en equilibrio con la forma glucopiranososa, la cual es favorecida por el pH fisiológico; este equilibrio aldehído enodiol permite que la glucosa sea reducida y oxidada con facilidad.

La glucosa se metaboliza enzimáticamente en el citoplasma celular principalmente por la vía glucolítica y además por la vía de las pentosas fosfato.

La glucólisis está catalizada por diez enzimas citosólicas solubles y consta de dos fases: a) fase preparatoria, donde la glucosa es fosforilada y convertida en gliceraldehído - 3 - fosfato; y, b) fase de rendimiento energético, donde el gliceraldehído - 3 - fosfato es convertido en piruvato y se da la formación acoplada de ATP. La finalidad de esta vía es la formación de dos moléculas de piruvato, cuatro moléculas de ATP y dos de NADH.

En presencia de oxígeno el piruvato y el NADH alcanzan la mitocondria y sufren un glucólisis aerobia teniendo como producto final la formación de 2 moléculas de Acetil CoA las cuales continúan el proceso de respiración celular.

En condiciones de anaerobiosis se produce en el citoplasma productos de fermentación como el ácido láctico para regenerar el NAD^+ necesario para la continuación de la glucólisis.

La vía de las pentosas fosfato es una ruta del metabolismo secundario de la glucosa, que se inicia a partir de la glucosa - 6 - fosfato, su finalidad es la producción de NADH para la biosíntesis de los ácidos grasos y de ribosa - 5 - fosfato precursor de la biosíntesis de los nucleótidos. (17)


El metabolismo energético del eritrocito es fundamentalmente mediante la glucólisis anaerobia (Vía de Embden-Meyerhof) con un consumo del 90 a 95% de la glucosa eritrocitaria lo cual conlleva a un consumo de la glucosa plasmática.

La glucosa plasmática ingresa en el proceso catabólico de la glucosa eritrocitaria mediante un transporte de membrana facilitado, metabolizándose en ácido láctico, para lo cual utiliza dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa y provee como máximo cuatro moléculas de ATP por cada molécula de glucosa, con una ganancia neta de dos moléculas de ATP. Además de

proveer 2,3 difosfoglicerato y NADH, para regular el suministro de oxígeno a los tejidos y mantener la hemoglobina en estado reducido, respectivamente (18).

La evaluación de los niveles de glucosa en pacientes diabéticos es de gran importancia, por lo que las decisiones terapéuticas dependen, entre otras cosas, de la fiabilidad de las determinaciones de glucosa en sangre. Si bien es cierto hoy en día, existen métodos diagnósticos de glucosa fuera del laboratorio como las tiras reactivas en orina y refractómetros (glucómetro), siempre se debe garantizar una buena calidad de las tiras, un funcionamiento fiable del refractómetro y la manipulación reproducible del sistema de análisis (19).

De acuerdo con la *American Diabetes Association (ADA)*, la DM “es un grupo de trastornos metabólicos caracterizados por la hiperglucemia resultante de los defectos de la secreción o la acción de la insulina, o ambas” (20) dando lugar a alteraciones del metabolismo glucosídico, lipídico, protéico e hidromineral. (12)

La DM es considerada como un problema de Salud Pública (19,20) que involucra muchos procesos fisiopatogénicos que varían desde la destrucción inmunitaria de las células  del páncreas productoras de insulina en la diabetes

tipo 1 hasta alteraciones que conllevan a la resistencia a la acción de la insulina en la diabetes tipo 2.

La ADA (20) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) (21) han propuesto la siguiente clasificación:

A. DM de tipo 1, que se caracteriza por la deficiencia absoluta de insulina, tendencia a la cetoácidos e insulino-dependencia; se subdivide en dos sub-grupos: (a) diabetes autoinmune, determinada genéticamente como consecuencia de una alteración en el brazo corto del cromosoma 6 (genes HLA) con la producción de anticuerpos anti-islotos (ICAs), anticuerpos antiglutamato decarboxilasa (anti-GADs) y anti tirosina fosfatasas IA2 e IA2 β ; y (b) diabetes idiopática, con igual comportamiento metabólico, pero sin asociación con marcadores de autoinmunidad ni de HLA (22).

B. DM de tipo 2, que tiene una base hereditaria con una gran predisposición genética que aun no es bien conocida. Se relaciona con cambios nutricionales y con el estilo de vida. Actualmente se observa un aumento de la incidencia de este tipo de diabetes en la infancia y en la adolescencia (22). La expresión fenotípica se caracteriza por células beta pancreáticas disfuncionales, que no

pueden liberar insulina adecuadamente en respuesta a la glucosa, así como por una resistencia a la insulina que conduce a una elevada producción de glucosa y a un descenso de la captación de glucosa por el músculo y el tejido adiposo (12).

C. Otros tipos específicos de DM: - por defectos genéticos en la función de la célula beta como las formas llamadas MODY (Maturity Onset Diabetes of the young); - con defectos genéticos de la acción de la insulina; - con patologías pancreáticas (pancreatectomía, pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, neoplasia del páncreas, hemocromatosis); - endocrinopatías (Cushing, acromegalia, glucagonoma, feocromocitoma); - inducida por fármacos o tóxicos (corticoides, ácido nicotínico, interferón alfa); - agentes infecciosos (rubeola congénita, citomegalovirus, parotiditis); y, - síndromes genéticos (Síndrome de Down, Síndrome de Klinefelter, Síndrome de Turner, Síndrome de Wolfram, entre otros). (22)

D. DM Gestacional, que se define como intolerancia a la glucosa que comienza o se diagnostica durante el embarazo, apareciendo generalmente alrededor de la semana 24 de gestación (20).

Entre las complicaciones agudas de la DM no controlada se encuentra la hiperglucemia con cetoacidosis y el síndrome hiperglucémico hiperosmolar. Y entre las complicaciones a largo plazo encontramos macroangiopatías, neuropatía periférica, enfermedad aterosclerótica cardiovascular, arterial periférica y cerebrovascular (12).

El Comité de Expertos en el Diagnóstico y Clasificación de la Diabetes Mellitus de la Asociación Americana de Diabetes en 1997 estableció como criterios diagnósticos de DM (22):

- Síntomas clásicos de diabetes y glucosa plasmática ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l) en cualquier momento del día, independientemente del tiempo transcurrido desde la última comida.
- Glucosa plasmática en ayunas ≥ 126 mg/dl (7,0 mmol/l).
- Glucosa plasmática a las 2 horas de una sobrecarga oral de glucosa ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l).
- Medición periódica de los valores de hemoglobina glucosilada (HbA1c)

La utilización del papel filtro como medio colector de sangre es un método sencillo y barato que proporciona facilidades en la toma de muestra en la población recién nacida e infantil, así como también, su utilización en campañas de salud en campo abierto y alejados de la ciudad y estudios epidemiológicos (23) donde el transporte y procesamiento de la muestra es prolongado y al no separar prontamente el suero o plasma de las células sanguíneas, éstas y especialmente los hematíes consumen esta glucosa como único sustrato metabólico para proveerse de energía mediante la glucólisis anaeróbica hasta la formación de ácido láctico (24) , la glucosa plasmática entonces tiende a disminuir a una velocidad de 7 mg/dL/h (25), lo que genera una inexactitud en la determinación de este metabolito.

Uno de los métodos más efectivos para lograr el estudio del analito presente en la sangre depositada sobre el papel filtro es mediante la precipitación de proteínas, lo cual se logra mediante agentes desnaturalizantes, que pueden ser: - agentes físicos como el calor o frío; y, - agentes químicos: detergentes, pH (ácidos y bases), fuerza iónica y disolventes orgánicos.

La precipitación de proteínas por ácidos fuertes se basa en la alteración del pH del medio en el cual estas se encuentran, ya que la mayoría de proteínas son

estables para una determinada zona de pH y al someterse a valores de pH muy altos o muy bajos pierden su actividad natural formando sales insolubles.

Los ácidos más utilizados para la precipitación de proteínas son el ácido tricloroacético (TCA), perclórico o clorhídrico.

La determinación de glucosa recogida en papel filtro en el laboratorio y la comparación de los resultados obtenidos mediante venopunción es fácil; estudios anteriores nos describen que la colección de la sangre periférica es recogida mediante punción digital o del talón con una lanceta estéril sobre papel filtro:

Wakelin y Hargton (1978), analizaron 15 muestras de sangre capilar en papel filtro Whatman® nº 4619 por duplicado durante ocho días confirmando que la variación en el tamaño del papel de filtro es una fuente de falta de precisión con un CV de 3% evaluando la reproducibilidad a partir de dos voluntarios (10 veces cada uno en dos días) (26).

En 1985, se evaluó el efecto de la toma de muestra de sangre capilar en papel de filtro para el análisis de glucosa comparado con el método de refractometría,

siendo el primero un excelente control de calidad para las determinaciones reflectométricas de glucosa en sangre. Se analizaron 32 muestras mediante ambos métodos encontrando una significativa correlación en los resultados. Para la determinación no refractométrica de glucosa en sangre seca se utilizó papel filtro Whatman® 31 ET Chroma, en discos de 6 mm eluidos con ácido sulfosalicílico y medidos mediante el método colorimétrico de glucosa oxidasa. Se comprobó la reproducibilidad del método calculando el coeficiente de variación de los valores de absorbancia en todos los puntos estándar durante un periodo de tres semanas, siendo el CV interensayo (n=11) de 9.9% e intraensayo entre 1.2 y 5.2% en los distintos niveles. Se evidenció que las concentraciones de glucosa en las muestras de sangre almacenadas en papel filtro a temperatura ambiente durante 23 días no presentan variaciones y que el hematocrito fuera del rango de 32 a 49% ejerce un efecto en las concentraciones de glucosa en muestras de sangre en papel filtro (27).

En Brasil (1996), se demostró que hay una correlación lineal entre los resultados de niveles de glucosa en papel filtro y las determinación en sangre venosa ($r=0.98$), analizando un total de 54 muestras colectadas en papel filtro 100% algodón (FITEC Ind & Com.) por duplicado repitiendo los ensayos a diario durante ocho días y posteriormente a intervalos durante cuatro semanas.

Las muestras de sangre fueron eluidas con TCA al 5% durante una hora a temperatura ambiente y fueron analizadas mediante método colorimétrico. El interensayo e intraensayo tuvo un CV de 6% (28).

El efecto del hematocrito en las manchas de sangre en papel filtro fue descrito por Skott al utilizar concentrados de muestras con hematocrito que van desde 24 a 68%, obteniendo una correlación negativa entre el diámetro de la mancha y el hematocrito (29), y por Mei y Alexander utilizando pools de sangre con hematocrito de 20 a 70% (30).

Los beneficios y aplicaciones de la tecnología de las gotas de sangre seca en papel de filtro han sido estudiadas por Parker y Cubitt en 1999, donde se describe que diferentes grados de papel de filtro Whatman® pueden ser utilizados para la colección de sangre, la cual es eluida en tampón fosfato salino tween 80 al 0.05% y ázida sódica 0,005% toda una noche a 4°C, siendo una de sus ventajas la reducción de riesgo de infecciones por derramamiento de muestras y reduce los costos de colección y transporte. (23)

Para la estandarización de un método analítico en laboratorio clínico se debe tener en cuenta los siguientes parámetros:

- **LINEALIDAD;** es la capacidad de un método de obtener resultados proporcionales a la concentración del analito en las muestras en un intervalo dado. Se obtiene realizando curvas de calibración con puntos de datos específicos para cada analito.
- **PRECISION;** expresa la concordancia de una serie de determinaciones entre si con respecto a su media.

Para su determinación se utilizan dos parámetros estadísticos: la desviación estándar (DS) y el coeficiente de variación (CV).

La estimación de la precisión (y algunas causas del sesgo) se obtiene a través de un diseño experimental

- **EXACTITUD;** que es el grado de concordancia entre el resultado de una determinación o la media de los resultados obtenidos y el valor real del analito en la muestra analizada.

Se calcula como el porcentaje de analito recuperado o por la diferencia entre el valor obtenido y el valor real evaluado estadísticamente.

- **ANALISIS BIAS;** que es la estimación del error sistemático de la medición que se puede estimar mediante: a) comparación de métodos, donde se analizan muestras con el nuevo método y un método de referencia con el fin de establecer si los dos métodos son estadísticamente comparables; b) esquemas interlaboratorios; c) control de la calidad externo, mediante a regresión lineal o el T test.

En nuestro país, no se han realizado estudios acerca de la estandarización de un método colector de sangre en papel filtro y su tratamiento, para la determinación de glucosa por lo que nuestra investigación se centra en encontrar un procedimiento sencillo, barato y eficaz que se pueda establecer como método estándar en campañas de salud en campo abierto en especial en estudios epidemiológicos o de vigilancia (31) donde hay una gran cantidad poblacional y donde el tiempo de transporte de la muestra hasta el laboratorio es muy prolongado ya que con este método se evitaría la tendencia de disminución de los valores de glucosa plasmática por los eritrocitos. Además de

ser útil en la toma de muestra en niños por ser un método menos invasivo a la punción venosa (23).y que tal vez pueda ser usado para la determinación de otros analitos.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. OBJETIVO GENERAL

Estandarizar la colección de sangre sobre papel filtro y su tratamiento, para la determinación de glucosa.

2.2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer la cantidad óptima de muestra de sangre, para una buena determinación de glucosa.

- Determinar el tipo de papel filtro adecuado para determinación de glucosa.

- Determinar el tiempo de permanencia del analito en la sangre seca sobre el papel filtro.

III. METODOS

3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

La investigación es aplicada, prospectiva, experimental.

3.2. DISEÑO

De intervención, con sistema de medición.

3.3. POBLACIÓN y MUESTRA:

Se trabajó con muestras sanguíneas de 20 voluntarios para la estandarización del método y con 25 muestras sanguíneas para la comparación de métodos.

Las muestras fueron recolectadas durante el mes de Octubre, Noviembre y Diciembre 2011, siendo procesadas en el Laboratorio del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición, “Alberto Guzmán Barrón”, Facultad de Medicina - UNMSM.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Voluntarios aparentemente sanos.
- Voluntarios varones y mujeres mayores de 18 años.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Muestras hemolizadas.
- Muestra insuficiente.

3.4. VARIABLE:

Estandarización de la colección de sangre en papel filtro y su tratamiento.

3.4.1. INDICADORES:

- Tiempo de secado.
- Volumen de muestra sanguínea.
- Concentración de TCA.

- Volumen de TCA.
- Volumen de desproteinizado.
- Determinación de glucosa.

3.5. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS

3.5.1. TÉCNICAS

3.5.1.1. PRECIPITACION DE PROTEÍNAS POR TCA

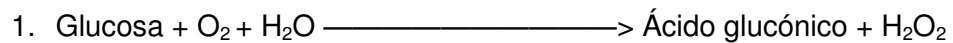
El TCA se usa ampliamente en bioquímica para precipitar proteínas en solución. Se utiliza el siguiente protocolo (32):

- Añadir el TCA necesario al extracto total de proteínas para obtener una concentración final de 10-20 % de TCA.
- Dejar precipitar en hielo por 30 minutos y centrifugar

3.5.1.2. DETERMINACIÓN DE GLUCOSA POR MÉTODO ENZIMÁTICO

La glucosa presente en la muestra reacciona con el reactivo enzimático que contiene una mezcla de las enzimas Glucosa Oxidasa y Peroxidasa. La glucosa de la muestra es oxidada a Acido Glucónico por acción de la glucosa oxidasa, liberando peróxido de hidrogeno.

Glucosa oxidasa



El peróxido de hidrogeno producto de esta reacción en presencia de peroxidasa reacciona con el Acido p-Hidroxibenzoico y 4-Aminoantipirina produciéndose un compuesto coloreado con un pico de absorción a 505 nanometros. La intensidad de color es proporcional a la concentración de glucosa de la muestra.

Peroxidasa



La muestra puede ser suero o plasma con heparina o EDTA. El método enzimático tiene una linealidad de hasta 600 mg/dL y un límite de detección de 2,0 mg/dL. (33).

3.5.2. EQUIPOS Y MATERIALES

3.5.2.1. EQUIPOS E INSTRUMENTOS

- Baño María a 37 °C, marca AVALIER[®] VL-32.
- Estufa, marca CLINICAL´S[®] modelo EC-401.
- Cronómetro.
- Espectrofotómetro, marca GREETMED[®] modelo NV203
- Centrífuga, marca GREEDMED[®] modelo GT119-300
- Refrigerador, marca LKB BROMMA[®] modelo 2023 a temperatura de 6 a 8 °C.
- Indicador de humedad y temperatura ambiental, marca BOECO GERMANY[®].
- Micropipetas 10 – 50, 1000, 100-1000 uL.
- Fiolas de vidrio clase A de 50 y 100 ml

3.5.2.2. MATERIALES Y REACTIVOS

- Papel de filtro WHATMAN[®] # 3.
- Papel de filtro normal.
- Puntas para micropipetas.
- Frascos de vidrio.
- Tubos de ensayo de 13 x 100 mm.
- Tubos de ensayo de 12 x 75 mm.
- Gradillas.
- Pinzas.
- Regla.
- Tijeras
- Alfileres.
- Poliestireno expandido (EPS) conocido como tecnopor.
- Guantes de goma.
- Agujas Vacutainer # 21.
- Tubos al vacío VACUETTE[®], con EDTA K₃.
- Acido Tricloroacético al 10 y 20 g%
- Reactivo líquido para la determinación enzimática de glucosa de la marca GT LAB[®], serie 0471, Lote 000910.

- Solución de Dextrosa al 5 g% estéril de marca B|BRAUN® lote 10641071.

3.6. PLAN DE PROCEDIMIENTOS Y ANÁLISIS DE DATOS

3.6.1. PLAN DE PROCEDIMIENTOS

3.6.1.1. ESTANDARIZACIÓN DEL TIPO DE PAPEL FILTRO, TIEMPO DE SECADO Y VOLUMEN DE MUESTRA SANGUÍNEA

Para estandarizar el tipo de papel filtro, se probó con dos tipos de papel filtro: Whatman® # 3 y papel filtro normal; se cortó cuadrados de 36, 64 y 100 mm² de cada tipo de papel y se depositó (por duplicado) con micropipeta 10, 20 y 30 uL de sangre en cada tamaño de papel y se dejó secar a temperatura ambiente.

Se controló el tiempo de secado tanto en papel filtro Whatman® # 3 y papel filtro normal a través de un cronómetro, Observando la

humedad como brillo a la luz tangencial, posteriormente se comprobó el tiempo de secado controlando el peso del papel, en una balanza analítica (sensibilidad 0,001g) desde la aplicación de la sangre hasta peso constante.

3.6.1.2. ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y VOLUMEN DE TCA

Se probó la reacción para la determinación de glucosa con el reactivo de glucosa oxidasa peroxidasa enzimático a punto final y estándar de glucosa de la casa comercial GT LAB[®]; añadiendo volúmenes de 0, 25, 50 y 100 uL de TCA al 20% se dejó incubar y se midió la densidad óptica de acuerdo al protocolo de trabajo del reactivo de la casa comercial, se observó la inhibición de la reacción de color.

Posteriormente se repitió el ensayo de la misma manera antes citada con TCA al 10% en volúmenes de 0 y 30 uL.

3.6.1.3. ESTANDARIZACIÓN DEL VOLUMEN DE SANGRE Y TCA 10% PARA EL DESPROTEINIZADO

Se cortó cuadrados de papel filtro Whatman[®] # 3 de 100 mm² de área y se depositó en cada papel filtro muestras sanguíneas en volúmenes de 20 y 30 uL, dejándose secar a temperatura ambiente en el tiempo estandarizado.

Se colocó cada papel filtro en tubos de ensayo y se agregó con 300 uL de TCA al 10%, dejando en reposo por 30 minutos, obteniéndose así el desproteínizado.

Se agregó 10, 20, 25, 30 y 40 uL del desproteínizado en tubos de ensayo con el reactivo enzimático, dejándose incubar y realizándose su lectura de acuerdo al protocolo de trabajo de la casa comercial del reactivo.

También se probó con TCA al 20% en volumen de 200 uL, con 20 uL de muestra sanguínea y agregando al tubo de ensayo con el reactivo enzimático 30 uL de desproteínizado.

3.6.1.4. EFECTOS DE LA AGITACIÓN EN LA DESPROTEINIZACIÓN

Se cortó cuadrados de papel filtro Whatman® # 3 de 100 mm² de área, agregando 20 uL de muestra sanguínea a cada papel y dejando secar por un tiempo de 16 minutos, controlando la temperatura y humedad.

Para probar el efecto de la agitación en el desproteínizado se colocó cada papel filtro en tubos con TCA al 10% en volumen de 300 uL y se dejó a temperatura ambiente por 30 minutos. Se probó con 0 agitaciones, 1 agitación y 3 agitaciones, con una n muestral de n = 10 en cada prueba, para luego incubarlo y medir la densidad óptica de acuerdo al protocolo de trabajo de la casa comercial del reactivo.

3.6.1.5. ESTANDARIZACIÓN DE LA TEMPERATURA EN LA DESPROTEINIZACIÓN

Se cortó cuadrados de papel filtro Whatman[®] # 3 de 100 mm² de área, agregando 20 uL de muestra sanguínea a cada papel y dejando secar por un tiempo de 16 minutos, controlando la temperatura y humedad.

Para probar el efecto de la temperatura en la desproteización se colocó cada papel filtro en tubos con TCA al 10% en volumen de 300 uL, dejando reposar 30 minutos a 5°C (baño de hielo) y a temperatura ambiente, con una n muestral de n = 10 en cada caso, para luego incubarlo y medir la densidad óptica de acuerdo al protocolo de trabajo de la casa comercial del reactivo.

3.6.1.6. EFECTO DE LA CENTRIFUGACIÓN EN LA DESPROTEINIZACIÓN

Se cortó cuadrados de papel filtro Whatman[®] # 3 de 100 mm² de área, agregando 20 uL de muestra sanguínea a cada papel y dejando secar por un tiempo de 16 minutos, controlando la temperatura y humedad.

Para probar el efecto de la centrifugación en la desproteinización se colocó cada papel filtro en tubos con TCA al 10% en volumen de 300 uL, con una n muestral de $n = 10$, dejando reposar 30 minutos a temperatura ambiente. Un grupo de muestras fue centrifugado por 7 minutos a 3500 r.p.m. y otro grupo fue incubado directamente. Se midió la densidad óptica de acuerdo al protocolo de trabajo de la casa comercial del reactivo.

3.6.1.7. DETERMINACIÓN DE LA LINEALIDAD DEL MÉTODO DE COLECCIÓN DE SANGRE

Se preparó estándares de 50, 75, 100, 125, 150, 200 y 250 mg% a partir de solución de dextrosa al 5% en fioles de 50 y 100 mL.

Se depositó en cuadrados de papel filtro en el tamaño, volumen de aplicación, tiempo de secado y volumen de TCA estandarizado, para posteriormente determinar la concentración de glucosa por el método de glucosa oxidasa usando el volumen estandarizado.

3.6.1.8. COMPARACIÓN DE MÉTODOS Y ESTIMACIÓN DEL FACTOR DE CORRECCIÓN

Para realizar la comparación de métodos se recolectó 25 muestras sanguíneas de voluntarios en tubos VACUETTE[®] con EDTA K₃, a las cuales se les realizó el método en estudio en sangre total y el método estándar en plasma, para determinar la concentración de glucosa por el método de glucosa oxidasa de la casa comercial del reactivo.

Al comparar los resultados obtenidos entre el método en estudio y el método estándar, se necesitó calcular para cada muestra un factor de corrección, para luego calcular la media de estos y obtener un factor de corrección medio.

3.6.2. ANALISIS DE DATOS

Para el estudio se realizaron las siguientes pruebas:

PRECISIÓN: Se realizó usando las siguientes formulas estadísticas:

MEDIA O PROMEDIO:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

DESVIACIÓN ESTÁNDAR MUESTRAL:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 n_i}{n-1}}$$

COEFICIENTE DE VARIACIÓN:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}}$$

ANÁLISIS BIAS (%):

$$\text{BIAS} = \left[\frac{\text{VALOR OBTENIDO} - \text{VALOR VERDADERO}}{\text{VALOR VERDADERO}} \right] \times 100$$

PRUEBA DE CORRELACIÓN R DE PEARSON:

En el caso de que se esté estudiando dos variables aleatorias X e Y sobre una población estadística; el coeficiente de correlación de Pearson se simboliza con la letra $r_{x,y}$, siendo la expresión que nos permite calcularlo:

$$\rho_{X,Y} = \frac{\sigma_{XY}}{\sigma_X \sigma_Y} = \frac{E[(X - \mu_X)(Y - \mu_Y)]}{\sigma_X \sigma_Y},$$

Donde:

σ_{XY} es la covarianza de (X,Y)

σ_X es la desviaciones típicas de la variable X

σ_Y es la desviaciones típicas de la variable Y

De manera análoga podemos calcular este coeficiente sobre un estadístico muestral, denotado como r_{xy} a:

$$r_{xy} = \frac{\sum x_i y_i - n \bar{x} \bar{y}}{n s_x s_y} = \frac{n \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{\sqrt{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \sqrt{n \sum y_i^2 - (\sum y_i)^2}}.$$

Interpretación: El valor del índice de correlación varía en el intervalo [-1,1]:

Si $r = 1$, existe una correlación positiva perfecta. El índice indica una dependencia total entre las dos variables denominada relación directa: cuando una de ellas aumenta, la otra también lo hace en proporción constante.

Si $0 < r < 1$, existe una correlación positiva.

Si $r = 0$, no existe relación lineal. Pero esto no necesariamente implica que las variables son independientes: pueden existir todavía relaciones no lineales entre las dos variables.

Si $-1 < r < 0$, existe una correlación negativa.

Si $r = -1$, existe una correlación negativa perfecta. El índice indica una dependencia total entre las dos variables llamada relación inversa: cuando una de ellas aumenta, la otra disminuye en proporción constante.

PRUEBA T DE STUDENT:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sigma_p \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}}$$

Donde:

t = valor estadístico de la prueba t de Student.

\bar{X}_1 = valor promedio del grupo 1.

\bar{X}_2 = valor promedio del grupo 2.

s_p = desviación estándar ponderada de ambos grupos.

N_1 = tamaño de la muestra del grupo 1.

N_2 = tamaño de la muestra del grupo 2.

3.7. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Para desarrollar el estudio se solicitó verbalmente la participación de personas voluntarias a modo de consentimiento informado señalándoles los detalles de su participación y asegurándoles mantener la confidencialidad y anonimato de cada una de las personas donantes de las muestras; además de entregar a cada donante su valor de glicemia sin costo alguno. **(ANEXO C)**

IV. RESULTADOS

Los resultados obtenidos de la estandarización del método de colección de sangre sobre papel filtro y su tratamiento para la determinación de glucosa, fueron los siguientes:

La estandarización del método de colección de sangre en papel filtro se llevó a cabo probando con áreas de papel filtro Whatman[®] # 3 y papel filtro normal de 36, 64 y 100 mm² con volúmenes de 10, 20 y 30 uL de sangre. Se encontró que el papel filtro adecuado fue el Whatman[®] # 3 con un área de 100 mm², para un volumen de 20 uL de sangre y un tiempo de secado óptimo de 16 minutos a temperatura ambiente de 20 a 22°C y humedad ambiental relativa de 65 a 68% **(Ver TABLA I y II).**

Al probar con concentraciones de TCA de 10 y 20% contra el reactivo enzimático y estándar de la casa comercial, se encontró que al usar TCA al 20% existe una inhibición total de la reacción de color al agregar 100 uL de TCA al 20% y una mínima inhibición de la reacción de color al agregar 25 uL de este (7.42 %), por lo que se probó con TCA al 10% en volumen de 30 uL

encontrando también mínima inhibición de la reacción de color (2.49%) (**Ver TABLA III y IV**).

Para realizar la estandarización del volumen de TCA al 10% se realizó nueve experiencias con distintos volúmenes de TCA al 10%, sangre seca en papel filtro y desproteinizado, observando que al añadir 200 uL de TCA al 10%, 20 uL de sangre seca y 30 uL de desproteinizado, el porcentaje de error total es menor (CV = 1.899 %). (**Ver TABLA V**).

Al probar si la agitación tiene algún efecto sobre la desproteinización se encontró que la variación es mínima ya que con 0 agitación el CV es de 1.108, con 1 agitación es de 2.926 y con 3 agitaciones es de 1.946 (**Ver TABLA VI**).

Respecto a la estandarización de la desproteinización, se halló que el efecto de la temperatura sobre la muestra tratada con TCA 10% es indistinta ya que las pruebas estadísticas t de Student y p de Pearson demuestran que no hay varianza significativa y hay una alta correlación entre ambos grupos de resultados (**Ver TABLA VII**).

Asimismo, al probar si la centrifugación tenía algún efecto sobre el desproteinizado, se halló que existe mínima variación entre las muestras centrifugadas (CV = 2.692) y las no centrifugadas (CV = 1.429) (**Ver TABLA VIII**).

Al realizar la determinación de la linealidad del método en estudio, se observó que el método es lineal hasta una concentración de glucosa de 250 mg% con un C:V de 1.26 % (**Ver TABLA IX, GRAFICO 1**).

Con las 25 muestras sanguíneas colectadas se encontró que existe una alta correlación ($r > 0.8$) entre los resultados obtenidos por el método en estudio y el método estándar, con un porcentaje de error total promedio de 7.45 %, por lo que se requirió de un factor de corrección medio de 1.076 obteniendo un porcentaje de error total de 4.26 % (**Ver TABLA X**). La ecuación matemática de la recta fue: $Y = 0.9672 x + 8.4685$ (**Ver GRAFICO 2**).

En la **TABLA XI** se comprobó que el analito depositado sobre el papel filtro tiene un tiempo de permanencia de hasta seis horas lo que logra optimizar el desempeño del método. También se observó un tiempo de permanencia del

analito en TCA al 10% es de siete días, conservado a una temperatura de 6 - 8°C (**Ver TABLA XII**).

El protocolo estandarizado para la colección de sangre en papel filtro y su tratamiento, para determinar glucosa consiste en usar cuadrados de papel filtro Whatman # 3 con un área de 100 mm², agregar 20 uL de sangre y dejar secar por 16 minutos a temperatura ambiente; desproteinizar el analito de interés (glucosa) con 200 uL de TCA al 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente sin agitación ni centrifugación; transferir 30 uL del desproteinizado a una tubo de ensayo añadiendo a la vez 1000 uL de reactivo de glucosa enzimático, leer la densidad óptica a 505 nm. (**Ver FIGURA 1**)

TABLA I:**ESTANDARIZACIÓN DE TIEMPO DE SECADO Y ÁREA DEL PAPEL FILTRO****PAPEL WHATMAN # 3**

LADO	6 mm		8 mm		10 mm	
ÁREA	36 mm²		64 mm²		100 mm²	
10 ul	8 min	8 min	1min20s	1min20s	50s	50s
20ul	65 min	64 min	34min	20 min	12 min	13 min
30 ul	86 min	85 min	58min	62min	33min	32min

PAPEL FILTRO NORMAL

LADO	6 mm		8 mm		10 mm	
ÁREA	36 mm²		64 mm²		100 mm²	
10 ul	26 min	26 min	8 min	8 min	6 min	6 min
20ul	69 min	69 min	51 min	48 min	33 min	33 min
30 ul	88 min	89 min	80 min	80 min	68 min	60 min

TABLA II:
ESTANDARIZACIÓN DEL TIEMPO DE SECADO (MEDIA)

n	minutos
1	13
2	12
3	12
4	12
5	12
6	13
7	12
8	12
9	15
10	13
11	12
12	11
13	11
14	11
15	15
16	12
17	12
18	12
19	14
20	12
MEDIA	12.4 min.
DS	1.24 min.
MEDIA + 3 DS	16 min.*

* Tiempo adecuado de secado.

TABLA III:
PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA REACCIÓN DE COLOR, POR TCA AL
20%

TUBO	1	2	3	4
Reactivo (mL)	1	1	1	1
TCA 20% (uL)	0	25	50	100
ST (uL)	10	10	10	10
H2O (mL)	0.1	0.075	0.04	0.00
DO	0.377	0.349	0.28	0.00
% INHIBICION	0	7.42	25.7	100

TABLA IV:

PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA REACCIÓN DE COLOR, POR TCA AL

10%

TUBO	1	2
GLUCOSA (mL)	1	1
TCA 10% (uL)	0	30
ST (uL)	10	10
H2O (uL)	30	0
DO	0.361	0.352
% INHIBICION	0	2.49

TABLA V:
ESTANDARIZACIÓN DEL VOLUMEN DE SANGRE, TCA 10% Y DEL
DESPROTEINIZADO

Experimento	EX 1	EX 2	EX 3	EX 4	EX 5	EX 6	EX 7	EX 8	EX 9
uL Mx en P.F.	20	30	20	30	20	30	20	20	20
uL TCA 10%	300	300	300	300	300	300	300	300	200
uL Desproteínizado	10	10	20	20	25	25	30	40	30
n	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Media Concentración	19.882	26.0389	65.000	81.6901	78.308	62.234	72.728	70.728	87.619
DS	0.839	0.980	1.3608	4.146	1.408	1.373	0.884	0.478	1.252
CV%	4.222	3.765	2.094	5.076	1.798	2.207	1.215	0.676	1.429
Concentración real	77.746	77.746	87.987	87.987	87.987	87.987	97.403	81.169	89.315
% error	74.427	66.508	26.125	7.157	11.000	29.269	25.333	12.863	1.899

TABLA VI:**EFFECTOS DE LA AGITACIÓN EN LA DESPROTEINIZACIÓN**

n	0 AGITACION	CON 1 AGITACION	CON 3 AGITACIONES
	D.O.	D.O.	D.O.
1	0.109	0.094	0.095
2	0.106	0.089	0.092
3	0.109	0.093	0.093
4	0.107	0.093	0.094
5	0.110	0.094	0.092
6	0.108	0.089	0.096
7	0.108	0.087	0.092
8	0.109	0.094	0.095
9	0.108	0.093	0.093
10	0.107	0.089	0.090
MEDIA	0.1081	0.0915	0.0932
DS	0.001197219	0.002677063	0.001813529
CV	1.107510638	2.925751986	1.945846997

TABLA VII:**ESTANDARIZACIÓN DE LA TEMPERATURA EN LA DESPROTEINIZACIÓN**

n	CON HIELO (5°C)		SIN HIELO	
	DO	[] g/dL	DO	[] g/dL
1	0.112	114.284	0.118	119.192
2	0.113	115.305	0.119	120.202
3	0.113	115.305	0.117	118.182
4	0.115	117.346	0.116	117.172
5	0.114	116.326	0.118	119.192
6	0.111	113.264	0.115	116.162
7	0.112	114.285	0.116	117.172
8	0.112	114.285	0.115	116.162
9	0.113	115.305	0.119	120.202
10	0.109	111.224	0.118	119.192
ST	0.098		0.099	
MEDIA	0.112	114.693	0.117	118.283
DS	0.002	1.680	0.002	1.539
CV	-----	1.465	----	1.301

t de STUDENT	t= 0,227
r de PEARSON	r= 0,82

TABLA VIII:

EFFECTO DE LA CENTRIFUGACIÓN EN LA DESPROTEINIZACIÓN

n	SIN CENTRIFUGACIÓN		CON CENTRIFUGACION	
	Abs	*[] g/dL	Abs	[] g/dL
1	0.098	88.89	0.099	89.06
2	0.097	87.30	0.100	90.63
3	0.098	88.89	0.101	92.19
4	0.097	87.30	0.103	95.31
5	0.096	85.71	0.103	95.31
6	0.096	85.71	0.099	89.06
7	0.097	87.30	0.100	90.63
8	0.098	88.89	0.102	93.75
9	0.098	88.89	0.100	90.63
10	0.097	87.30	0.099	89.06
ST	0.105		0.106	
MEDIA (x)	0.097	87.619	0.101	91.563
DS	0.001	1.252	0.002	2.465
CV	-----	1.429	-----	2.692

* [] = concentración

TABLA IX:

DETERMINACIÓN DE LA LINEALIDAD

*[] GLUCOSA	DO	DUPLICADO	MEDIA(X)	DS	CV (%)
0	0	0	0	0	0
50	0,0580	0,0580	0,0580	0,00	0
75	0,0760	0,0720	0,0740	0,00	3,82219882
100	0,0950	0,0920	0,0935	0,00	2,26879181
125	0,1180	0,1180	0,1180	0,00	0
150	0,1460	0,1440	0,1450	0,00	0,9753197
200	0,1800	0,1820	0,1810	0,00	0,78133346
250	0,2260	0,2230	0,2245	0,00	0,94490884

* [] = concentración

r de pearson	0,9978
CV% =	1,26

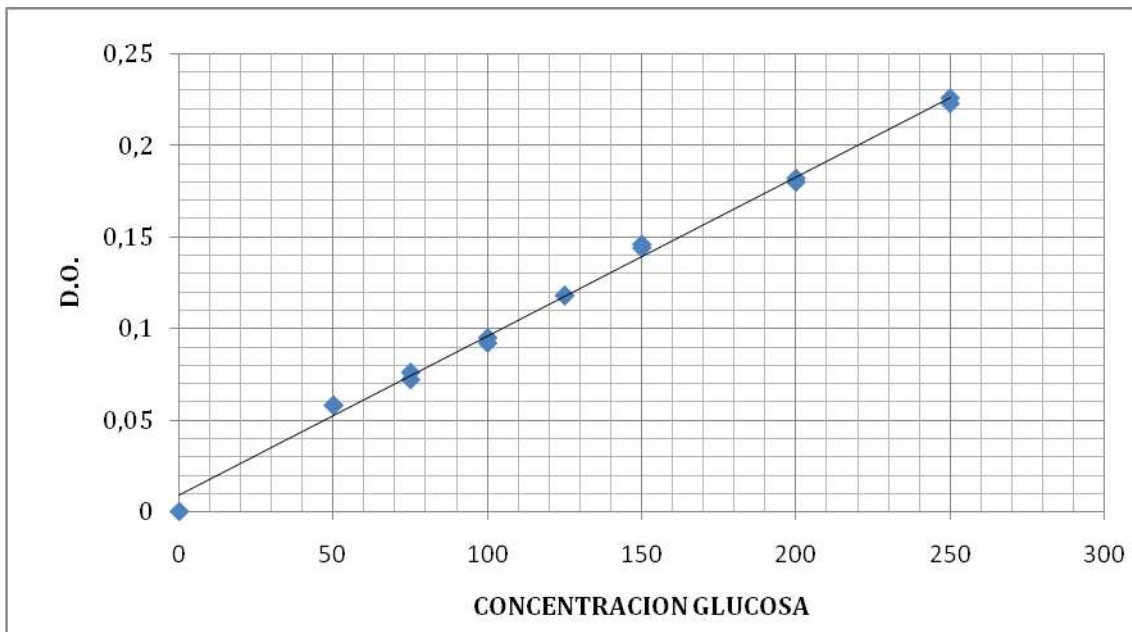


GRAFICO 1:

DETERMINACIÓN DE LA LINEALIDAD DEL MÉTODO DE COLECCIÓN DE SANGRE SOBRE PAPEL FILTRO.

TABLA X:

**COMPARACIÓN DEL MÉTODO DE COLECCIÓN EN PAPEL CON SUERO
FRESCO PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA.**

n	MX	P.F	FACTOR	% ERROR		
				P.F CORREGIDO	P.F. CORREGIDO	
1	54.76	53.20	1.029	57.19	4.44	
2	80.77	73.15	1.104	78.636	2.64	
3	87.77	79.80	1.099	85.785	2.26	
4	76.50	73.15	1.046	78.636	2.79	
5	95.50	88.35	1.081	94.976	0.55	
6	77.67	75.99	1.022	81.689	5.17	
7	99.81	93.10	1.072	100.082	0.27	
8	106.02	100.70	1.053	108.253	2.11	
9	97.09	91.19	1.065	98.0293	0.97	
10	96.08	87.92	1.093	94.517	1.62	
11	97.65	89.86	1.087	96.594	1.08	
12	88.54	78.26	1.131	84.130	4.98	
13	55.26	50.24	1.099	54.009	2.26	
14	96.70	87.92	1.099	94.517	2.26	
15	69.39	57.97	1.197	62.319	10.19	
16	71.59	76.33	0.938	82.053	14.62	
17	108.95	105.31	1.035	113.213	3.91	
18	85.40	68.60	1.245	73.744	13.65	
19	91.37	87.92	1.039	94.517	3.45	
20	102.98	91.79	1.122	98.671	4.19	
21	83.52	80.19	1.041	86.208	3.22	
22	88.23	84.06	1.049	90.362	2.42	
23	81.63	78.26	1.043	84.130	3.06	
24	93.56	95.65	0.978	102.826	9.90	
25	70.64	62.80	1.125	67.512	4.43	
MEDIA		---	1.075	----	7.45	4.26
R DE PEARSON		0.951	---	0.951	---	---

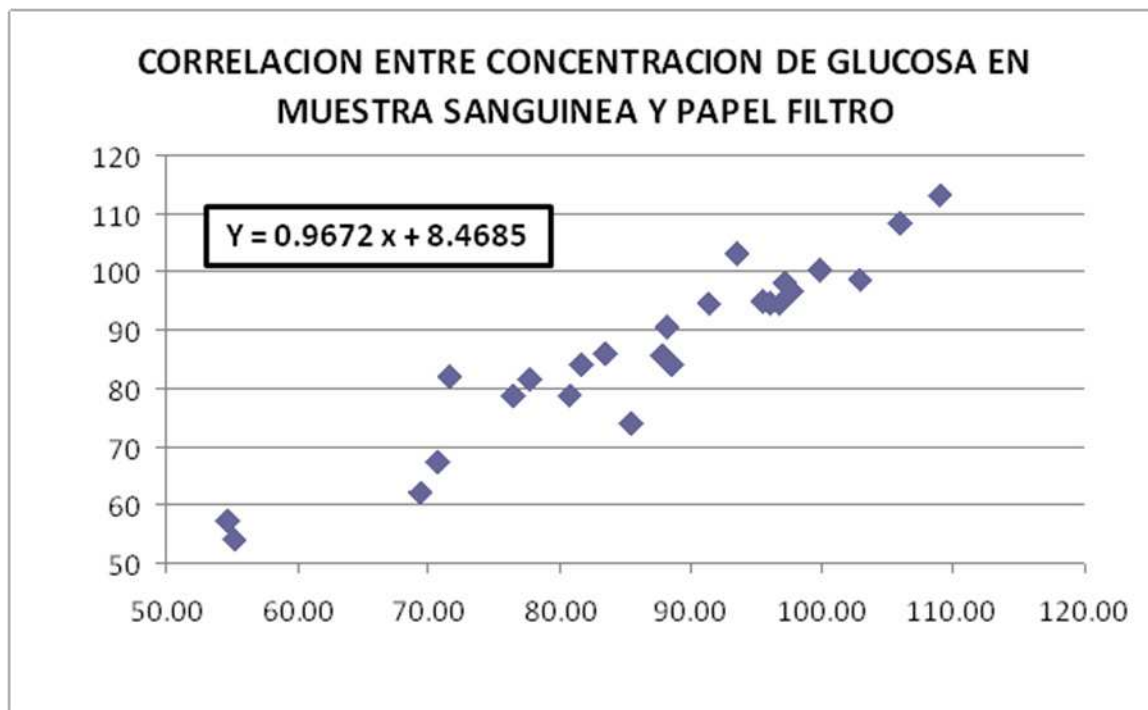


GRAFICO 2:

CORRELACIÓN ENTRE CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA EN MUESTRA SANGUÍNEA Y PAPEL FILTRO

TABLA XI:

**TIEMPO DE PERMANENCIA DEL ANALITO SOBRE EL PAPEL FILTRO
(HORAS)**

TIEMPO (HORA)	D.O. (X)	[]	FACTOR	[] CORREGIDA
0	0.054	56.842	1.4642	84.695
1	0.054	56.842	1.4642	84.695
2	0.053	55.789	1.4919	83.126
3	0.053	55.789	1.4919	83.126
4	0.052	54.737	1.5206	81.558
5	0.053	55.789	1.4919	83.126
6	0.049	51.579	1.6136	76.853

TABLA XII:

TIEMPO DE PERMANENCIA DEL ANALITO TRATADO CON TCA AL 10%

(DIAS)

TIEMPO (DIAS)	D.O. (X)	[]	FACTOR	[] CORREGIDA
1	0.112	70.728	1.1476	81.4433
3	0.112	70.728	1.1476	81.4433
5	0.111	70.253	1.1554	80.8963
7	0.111	70.728	1.1554	80.8963



FIGURA 1:

FLUJOGRAMA DE TRABAJO

V. DISCUSIONES

La colección de muestra sanguínea para determinar cualquier analito se realiza por vía venosa o por punción digital; y una vez colectada la muestra, ésta debe ser llevada pronto al laboratorio para su procesamiento y así evitar alteraciones en la composición o niveles de algunos metabolitos.

Las campañas de salud en campo abierto tienen gran cantidad de pacientes, la colección de la muestra se realiza en el campo y el transporte de la muestra hasta el laboratorio generalmente es muy prolongado (en nuestra experiencia desde el inicio de la toma de muestra a las 7:30 am y su llegada al laboratorio a las 12pm) lo cual genera una tendencia de disminución de ciertos analitos, principalmente de la glucosa plasmática, ya que al no ser separada prontamente de las células sanguíneas es consumida por los eritrocitos como único sustrato metabólicos para generar energía mediante la glucólisis anaerobia o Vía de Embden-Meyerhof, con un consumo del 90 a 95% de la glucosa eritrocitaria.

La glucosa plasmática ingresa en el proceso catabólico de la glucosa eritrocitaria mediante un transporte de membrana facilitado, llegando a formar

ácido láctico, para lo cual utiliza dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa y provee como máximo cuatro moléculas de ATP por cada molécula de glucosa, con una ganancia total de dos moléculas de ATP. Además de proveer 2,3 difosfoglicerato y NADH, para regular el suministro de oxígeno a los tejidos y mantener la hemoglobina en estado reducido, respectivamente (18).

Entonces la glucosa plasmática tiende a disminuir a una velocidad de 7 mg/dL/h (25), aunque nuestra experiencia encontró que el consumo de glucosa disminuye en un 23.35% a la hora de colectada (**Ver ANEXO A**); lo cual genera una inexactitud en la determinación de este analito.

La determinación de los niveles de glucosa en la población en general es de gran importancia ya que es fuente diagnóstica de DM, una de las enfermedades crónicas consideradas actualmente como problema de salud pública (13,14); además de ser de gran importancia en pacientes declarados diabéticos, ya que las decisiones terapéuticas dependen principalmente de la fiabilidad de estas determinaciones.

Si bien es cierto hoy en día, se encuentra estandarizado el método de determinación de glucosa en suero o plasma, además de existir métodos diagnósticos de glucosa fuera del laboratorio como refractómetros

(glucómetro); en el presente estudio se plantea el uso del papel filtro como un medio colector de sangre para determinar glucosa, ya que resulta ser un método sencillo y fiable.

El uso del papel filtro como medio colector de sangre fue descrito en 1913 por Bang (1), y desde esa fecha se han realizado estudios para determinar diferentes metabolitos a través de este medio.

En Latinoamérica se han realizado estudios del uso del papel filtro como medio colector de sangre, pero en nuestro país no se evidencian estudios sobre la estandarización de un método de colección de sangre en papel filtro y su tratamiento, para determinar glucosa.

La estandarización de métodos analíticos en el laboratorio clínico comprende según la “Guía para validación de métodos de ensayo”, los siguientes parámetros estadísticos: precisión, exactitud, linealidad, límite de detección, entre otros (34), dependiendo del tipo de ensayo que se realice.

La estandarización de este método se realizó teniendo en cuenta todas las posibles interferencias que pueden haber en la desproteínización de la muestra

en el papel filtro, tal como el efecto de la temperatura, agitación, centrifugación, concentración de TCA, para así poder obtener un resultado fiable y verdadero, siendo el valor del hematocrito el único parámetro que no se midió, ya que se tiene referencia que la concentración de glucosa no varía si el hematocrito se encuentra entre 20 a 70% (30).

El papel filtro de celulosa, al ser fabricado a partir de algodón, tiene como principal ventaja la retención de partículas muy pequeñas presentes en sangre o cualquier otro fluido, además de encontrarse presentaciones con diferentes grados de retención.

Para el método en estudio se determinó que el papel filtro adecuado para el método es el papel filtro Whatman # 3 ya que el tiempo de secado de la muestra sanguínea fue más corto que el tiempo en papel filtro normal, lo cual se debe a que este tipo de papel filtro de celulosa puede retener partículas desde 6 μ m teniendo así una adsorbancia superior al papel filtro normal.

Al estandarizar el tiempo de secado, la media obtenida fue de 12.4 minutos, pero para optimizar el método se determinó que el tiempo adecuado sería

media + 3 DS, por lo que el tiempo de secado adecuado es de 16 minutos como mínimo.

Como se ha descrito anteriormente, para la determinación de glucosa en una muestra sanguínea es importante que sea procesada y separada del suero o plasma rápidamente, ya que ésta es consumida por los hematíes, generando una inexactitud en la determinación del analito. En el método en estudio se observó que la concentración de glucosa presente en la sangre seca en papel filtro no presenta variación durante 6 horas sin ser tratadas con TCA, por lo que es un método adecuado para ser utilizado en campañas en campo abierto donde el transporte de las muestra es prolongado; a la vez se comprobó que la muestra tratada con TCA al 10% no presenta variación hasta 7 días, lo cual corrobora lo descrito por Wakelin y Hargton en 1978 (26).

Es necesario realizar la verificación de los procedimientos del método en estudio antes de ponerlo en práctica, por lo que la validación puede hacerse analizando un conjunto de muestras que han sido analizadas por otro método, para lo cual el analista debe asegurarse de haber alcanzado el grado deseado de precisión y exactitud; por lo que la precisión del pipeteo tanto al depositar la muestra sanguínea sobre el papel filtro como al extraer el desproteinizado es

un parámetro importante que define que el método en estudio sea efectivo, ya que así se disminuye el porcentaje de error de la prueba, y se obtiene una correlación entre métodos (estándar y en estudio) lineal.

La linealidad de un método analítico se refiere a la proporcionalidad entre la concentración de analito en la muestra y el resultado obtenido, este paso de la estandarización es necesario si se trabaja con un solo estándar en las determinaciones de rutina,

En este estudio se obtuvo una correlación lineal con una r igual a 0.951 (**Ver TABLA X**) lo cual supera lo descrito por Sterian, Britto en 1996 (28), quienes obtuvieron en su estudio una r igual 0.8.

De acuerdo a los resultados obtenidos (**Ver TABLA X**), hemos observado la necesidad de un factor de corrección, ya que dichos resultados fueron en su mayoría inferiores al valor real, debido probablemente al porcentaje de inhibición, sin embargo, después de la corrección los resultados mostraron mayor reproducibilidad entre sí.

Al ser un método sencillo, menos costoso y fácil de realizar, es ideal para poder ser utilizado en campañas de salud en campo abierto donde el transporte de la muestra hasta el laboratorio es prolongado, además de requerir una cantidad mínima de muestra sanguínea (20 uL) y su procesamiento puede ser realizado por cualquier profesional bien entrenado.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. CONCLUSIONES

1. El papel filtro adecuado para la experiencia es el Papel Whatman[®] # 3 con una superficie de 100 mm².
2. El volumen adecuado de sangre depositada sobre el papel es de 20 uL y el tiempo de sedado es de 16 minutos como mínimo.
3. La estandarización de la desproteínización es 200 uL de TCA al 10% en reposo de 30 minutos. No requiere baño de hielo ni centrifugación.
4. El volumen del desproteínizado adecuada para la determinación de glucosa es 30 uL.
5. Existe alta correlación entre los resultados obtenidos por el método del papel de filtro con el método de determinación líquida enzimático a punto final.

6. La linealidad probada fue hasta 250 mg/dL de glucosa

7. El tiempo de duración del analito en el papel filtro es mayor a 6 horas, y la muestra tratada con TCA al 10% un tiempo de 7 días.

Conclusión final:

El método de colección de sangre en papel de filtro y su tratamiento con TCA para la determinación de glucosa es útil y válido.

6.2. RECOMENDACIONES

- El método en estudio puede implementarse en campañas en campo abierto donde el transporte de la muestra al laboratorio es prolongado.

- El método en estudio es un método sencillo de poner en práctica, por lo que cualquier personal entrenado puede realizarlo.

- Se deberían realizar otros estudios para observar la validez del método para otros analitos, tales como urea, ácido úrico y creatinina.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bang I. Ein Verfahren zur Mikrobestimmung von Blutbestandteilen. Bioche. Ztschar. 1913; 49: 19-39.
2. Gurthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. Pediatrics 1963; 32: 338-43.
3. Smith I, Cook B, Beasley M. Review of neonatal screening programme for phenylketonuria. BMJ 1991; 303: 333-5.
4. Torres E, Baoly A, Frometa A, Fernandez L. Determinación de fenilalanina y galactosa total a partir de una muestra de sangre seca en papel filtro: Aplicación al tamizaje neonatal. Biomedica 2002; 22: 22-29.
5. Quraishi R, Laksshmy R, Prabhakaran D, Mukhopadhyay AK, Jailkhani B. Use of paper stored dried blood for measurement of triglycerides. Lipids in Health and Disease 2006; 5:20.
6. McDade T W, Shell-Duncan B. Whole blood collected on filter paper provides a minimal invasive method for assessing human Transferrin Receptor level. JN 2002; 3760-3763.

7. Elnagar B, Gebre-Medhin M, Larsson A, Karlsson FA. Iodine nutrition in Sudan: Determination of thyroid-stimulating hormone in filter paper blood samples. *Scand J Clin Lab Invest* 1997; 57: 175-182.
8. U Das, A J Whatmore, J Khosravi, J K H Wales, G Butler, M S Kibirige, et al. IGF-I and IGF-binding protein-3 measurements on filter paper blood spots in children and adolescents on GH treatment: use in monitoring and as markers of growth performance. *European J Endocrinology* 2003; 149: 179–185.
9. Alfazil AA , RA Anderson .Stability of benzodiazepines and cocaine in blood spots stored on filter paper. *J anal Toxicol* 2008; 32 (7) :511-515.
10. Kain K C., Lanar D E. Determination of Genetic Variation within *Plasmodium falciparum* by Using Enzymatically Amplified DNA from Filter Paper Disks Impregnated with Whole Blood. *J Clin Microbiology* 1991; 29 (6): 1171-1174.
11. Filtros de papel y membranas [pagina web en Internet]; [accesado 25 Enero 2012]; Disponible en: http://www.rodellab.com/index_archivos/Whatman/02_Filtros.pdf
12. Gonzales de Buitrago, J.M. *Bioquímica Clínica*. 1ª ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana, 1998. p. 343 – 358.

13. Epidemiología de la diabetes mellitus en el mundo. En: Manual de diabetes mellitus. 1ra ed., Costa Rica, Pfizer 1982:13-28.
14. Moreno Altamirano L. Epidemiología y diabetes. Rev Fac Med UNAM 2001 Enero-Febrero; 44 (1).
15. Villena J. Epidemiología de la diabetes mellitus en el Perú. Rev Med Peru 1992; 64 (347): 71-75.
16. Sociedad Peruana de Endocrinología. Consenso sobre prevención, diagnóstico, tratamiento y control de la diabetes mellitus y la intolerancia a la glucosa. Lima, Multiservicios Cinthia E.I.R.L. 1998.
17. Koolman J, Rohm K. Bioquímica: Texto y Atlas. 3ª ed. España: Médica Panamericana. 2004. p. 150 – 152.
18. Rodak, Bernadette F. Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas. 2ª ed. España: Médica Panamericana. 2005. p. 101 – 104.
19. Von Schenck H, Lonnstrom L, Engstrom M. Quality Control of Reflectometric Determinations of Glucose in Dried Blood Spots on Filter Paper. Clin. Chem 1985; 31 (5): 706-709.
20. ADA. Expert Committee on the diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. Report of the Experts. Diabetes Care 1997; 20: 1183-9.
21. Alberti KGMM, Zimmet PZ, WHO. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1:

- diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation. *Diabetic Med* 1998;5:539-53.
22. Lopez Sigüero, J P, Del Pino, A. Diabetes mellitus tipo1: Concepto, clasificación y diagnóstico. *An Pediatr Contin* 2003; 1(1):15-20.
23. Parke, S P; Cubitt, W D. The use of the dried blood spot simple in epidemiological studies. *J. Clin. Pathol* 1999; 52:633-639.
24. Gonzales de Buitrago J.M. *Bioquímica Clínica*. 1ª ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana, 1998. p. 435-436.
25. Precauciones previas para tomar examen de glucosa [pagina web en internet]; [accesado 10Febrero 2012].. Disponible en: <http://www.elgotero.com/Archivos%20zip/Precauciones%20Previas%20para%20%20Tomar%20Examen%20de%20Glucosa.pdf>
26. Wakelin K, Goldie DJ, Hartog M, Robinson AP. Measurement of capillary blood glucose in filter-paper spots : An aid in the assessment of diabetic control. *Br Med J* ii. 1978; 2, 468-469.
27. McDade T W, Shell-Duncan B. Whole blood collected on filter paper provides a minimal invasive method for assessing human Transferrin Receptor level. *JN* 2002; 3760-3763.
28. Sterian Ward L, Britto Novis R, Toledo Nasimiento V, Siesler Nobrega M, Abdalla Saad M. Determination of glucose levels using dried filter

- paper blood spots: new perspective in home monitoring. Sao Paulo Med J 1996; RPM 114 (1) 1100-1103.
29. Skopp, G. Blood Spot Analysis. [página web en internet]. Germany: Institute of Legal Medicine and Traffic Medicine, Ruprecht-Karls University. [accesado 10 Febrero 2012]. Disponible en: www.icadts2007.org/print/128bloodspotanalysis.pdf
30. Joanne V. Mei, J. Richard Alexander, Barbara W. Adam, W. Harry Hannon. Use of Filter Paper for the Collection and Analysis of Human Whole Blood Specimens. J. Nutr. 2001 May 1; 131 (5) : 1631S-1636S.
31. Parker S.P, Cubitt W.D. The use of the dried blood spot sample in epidemiological studies, J.Clin. Pathol. 1999; 52(9), 633-639.
32. CINVESTAV [pagina Web en internet] México: Unidad de Genomica, Proteonica y Metabolica; [accesado 12 Febrero 2012]. Métodos de precipitación para limpieza de proteínas. Disponible en: <http://www.cinvestav.mx/Portals/0/deptos/genomica/Precipitaci%C3%B3n%20de%20prote%C3%ADnas.pdf>
33. Trinder P. Ann Clin Biochem. 1969; 6: 24.
34. INDECOPI [pagina Web en Internet] Perú: Aprueban Guía para la validación de Métodos de Ensayo y las Directrices para la Implementación y Evaluación de Métodos de Ensayo Sensoriales.

[Accesado 12 Febrero 2012] Disponible en:

<http://www.indecopi.gob.pe/repositorioaps/0/0/jer/acre01/guiaValidacion.pdf>

VIII. ANEXOS.

ANEXO A:

TABLA: CONSUMO DE GLUCOSA

CONSUMO DE GLUCOSA

Horas	g/dL	% de consumo
0	102,8	0
1	78,8	23.35
2	68,0	33.85
3	58,0	43.58

ANEXO B:

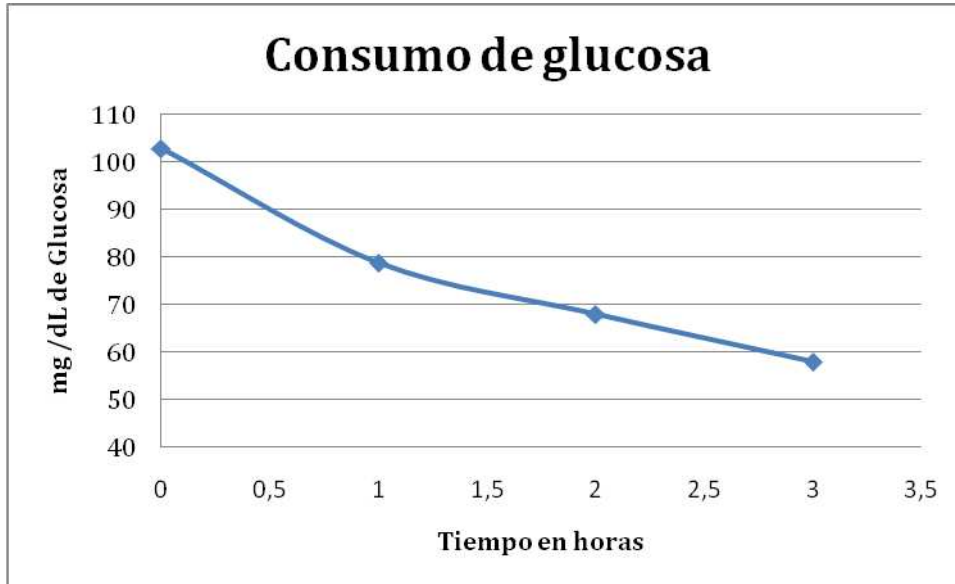
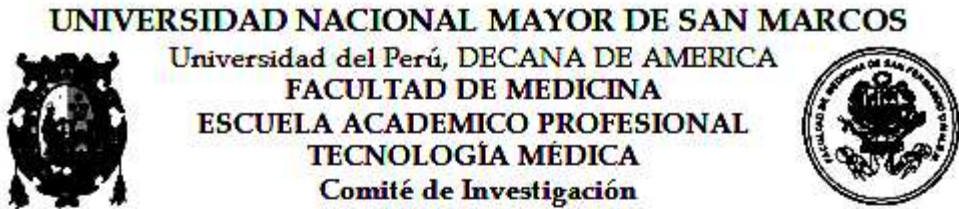


GRAFICO: CURVA DE CONSUMO DE GLUCOSA

ANEXO C:

FORMATO DE ENTREGA DE RESULTADOS



Nº

Fecha: Lima, de de 2011.

Resultado de glucosa en sangre

Paciente: Apellidos:

Nombre:

Muestra utilizada: Sangre con anticoagulante EDTA.

Resultado de glucosa: mg/dL
