

Determinación del nitrógeno ureico y de la glucosa en 0,25 ml de sangre capilar

por

José Miguel Jiménez*

(Recibido para su publicación el 15 de octubre de 1959)

La dificultad de no disponer de suficiente cantidad de sangre para hacer las determinaciones cuantitativas de sus componentes, ha llevado a los investigadores a procurar el uso de microtécnicas (4, 5). No obstante, junto con las ventajas de poder trabajar con cantidades muy pequeñas de sangre, se presentan algunos inconvenientes en cuanto a la exactitud y la sensibilidad de los métodos.

La presente modificación, al macrométodo de la ureasa propuesto por Karr y Looney (citados por BRAY (1)) para la determinación cuantitativa de la urea sanguínea, es el resultado de estudios comparativos entre los diversos métodos más usados y recomendados en la actualidad (2, 3, 4, 5). Consideramos que la simplicidad de la técnica y la sensibilidad de la misma, hacen de éste un método sumamente práctico. Además posee la ventaja de aprovechar una cantidad muy pequeña de sangre (0,25 ml) para hacer sobre ella las determinaciones conjuntas del nitrógeno ureico y la glucosa. Los trabajos experimentales llevados a cabo con el micrométodo propuesto, han dado resultados altamente satisfactorios con una sensibilidad al milígramo, usando soluciones patrón de concentración conocida.

MICROTECNICA PARA EL NITROGENO UREICO SANGUINEO

- 1) Tómense dos tubos de ensayos de 13 x 100 mm y póngase en cada

* Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Letras, Universidad de Costa Rica.

uno de ellos 1 ml de agua destilada; añádanse, agitando bien, 0,25 ml de la solución ureasa-fosfato*.

2) Al primer tubo añádanse 0,25 ml de sangre capilar.

(Para la obtención de la muestra hágase una incisión profunda de la yema del dedo y recójase la sangre en un tubo de ensayos de 8 x 75 mm. Para evitar la coagulación agítase la sangre con un aplicador de madera, el cual ha sido previamente humedecido en una solución de oxalato de potasio al 20%).

3) Al segundo tubo añádanse 0,25 ml de agua destilada.

Todas las operaciones siguientes deben efectuarse simultáneamente en ambos tubos, el primero de los cuales representa la incógnita y el segundo la concentración cero.

4) Mézclese bien e incúbese durante 15 minutos a 50° C en baño de agua.

5) Añádanse 2,5 ml de agua destilada; 0,5 ml de ácido sulfúrico 2/3 N y 0,5 ml de tungstato de sodio al 10 por ciento.

6) Mézclese bien y centrifúguese durante 5 minutos a 3.000 r. p. m.

7) Con una pipeta póngase 1,0 ml del centrifugado claro y libre de proteínas de cada tubo, respectivamente, en dos tubos de ensayos.

8) Añádanse 8,0 ml de agua destilada y 1,0 ml de reactivo de Nes-sler.

9) Mézclese. Déjese en reposo por un minuto. Léase en el fotocolorímetro, usando el filtro azul de 420 m μ , el porcentaje de transmisión de la incógnita en comparación con la solución "blanco" ajustando a 100 por ciento de transmisión. Búsqese en la tabla de calibración el valor correspondiente a la lectura.

MICROTECNICA PARA LA GLUCOSA SANGUINEA

I. *Para hacer las determinaciones cuantitativas del nitrógeno ureico y la glucosa simultáneamente, procédase de la manera siguiente:*

1) Tómense dos tubos de Folin graduados a 12,5 ml y a 25,0 ml. Con una pipeta ponga en el primero 2,0 ml del centrifugado claro y libre de proteínas obtenido para hacer la determinación del nitrógeno ureico. En el segundo tubo ponga 2,0 ml del centrifugado claro del "blanco". En ambos tubos deben efectuarse todas las operaciones siguientes:

2) Añádanse 2,0 ml de reactivo de tartrato alcalino de cobre.

3) Agítense e introdúzcanse los tubos en un baño de agua hirviente por 10 minutos.

* a) Fosfato disódico 0.05 molar. b) Ureasa en polvo (Harlington Chemical Company, o E. R. Squibb & Sons Inc.). Inmediatamente antes de que se vaya a hacer la determinación, póngase en un tubo de ensayos 10 ml de la solución de fosfato disódico (a) y añádanse 0.1 gm de la ureasa en polvo. Mézclese bien agitando vigorosamente. Esta solución de ureasa-fosfato no debe ser usada después de transcurridas más de 6 horas de su preparación.

- 4) Enfríese. Adiciónese 2,0 ml de reactivo de ácido fosfomolibdico.
- 5) Dilúyase con agua destilada, el tubo que contiene la incógnita a 12,5 ml. y a 25 ml el tubo de concentración cero (el "blanco" se diluye al doble para evitar que éste tenga una densidad óptica muy elevada).
- 6) Agítense y déjense en reposo por 10 minutos.
- 7) Léase en el fotoclorímetro usando el filtro de 420 $m\mu$ en la forma indicada.

II. *Para hacer la determinación de la glucosa solamente, procédase de la manera siguiente:*

- 1) Hágase un *filtrado* o centrifugado libre de proteínas de la sangre en estudio así:
 - a) Tómense dos tubos de ensayos y póngase en cada uno de ellos 3,75 ml de agua destilada; adicione al primero 0,25 ml de sangre capilar; al segundo 0,25 ml de agua destilada. El primero de los tubos representa la incógnita y el segundo el blanco.
- 2) Tómense dos tubos de Folín graduados a 12,5 y 25 ml. Con pipeta póngase en el primero 2,0 ml del centrifugado claro y libre de proteínas y márqueselo como incógnita. En el segundo póngase 2,0 ml del blanco.
- 3) Continúese siguiendo las instrucciones dadas anteriormente para la determinación conjunta de la glucosa y el nitrógeno ureico.

RESUMEN

Se ha querido proponer una modificación al método clásico de la ureasa para la determinación cuantitativa del nitrógeno ureico y de la glucosa usando sangre capilar. Dicha modificación consiste además de la indicación del uso de 0.25 ml de sangre, en el uso de una solución de ureasa-fosfato como fuente de la enzima que actuará liberando el nitrógeno de la urea sanguínea.

En el transcurso de las determinaciones experimentales, se pudo demostrar que con la adición de una cantidad precisa y constante de la solución de ureasa-fosfato, se eliminaba el error atribuido a otras técnicas. Asimismo, se propone una microtécnica para la determinación de nitrógeno y de la glucosa simultáneamente.

SUMMARY

A modification to the classical urease method is proposed. Dosage of blood ureic nitrogen and glucose can be made with 0.25 ml of capillary blood. The use of phosphate-urease solution is suggested as a source of the enzyme.

This technique standardizes the amount of enzyme, therefore avoiding error. The 420 $m\mu$, blue filter is used for both photolorometric determinations.

BIBLIOGRAFIA

1. BRAY, W. E.
1941. *Sinopsis de los métodos bioquímicos de laboratorio*. 456 pp. Editorial UTEHA.
2. GRADWHOL, R. B. H.
1948. *Clinical laboratory methods and diagnosis*. 4ª ed., Volumen I, viii + 1295 pp., *The C. V. Mosby Co.*. St. Louis, Mo.
3. KOLMER, W. Q. & F. BOERNER
1948. *Methods of clinical laboratory*. 4ª ed., xxxiii + 1083 pp. Editorial Interamericana S. A., México, D. F.
4. OPAL, E. H.
1957. *Manual of clinical laboratory methods*. 4ª ed., ix + 361 pp. Charles C. Thomas, Springfield, Ill.
5. PHOTOVOLT CORPORATION
1957. *Clinical Photoelectrical Colorimeter*. Reference book for clinical tests. N. Y. 146 pp.