

DOCUMENTOS TÉCNICOS PARA EL LABORATORIO CLÍNICO

RECOMENDACIONES PARA EL ANÁLISIS DE LÍQUIDOS BIOLÓGICOS

1 DE ABRIL, 2016

AUTORES:

BQ. René Gómez Lagos.

Jefe Sección Química Clínica. Subdepartamento Enfermedades No Transmisibles. Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia. Instituto de Salud Pública de Chile.

BQ. Paola Pellegrini Pinto.

Profesional Sección Química Clínica. Subdepartamento Enfermedades No Transmisibles. Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia. Instituto de Salud Pública de Chile.

TM. Eduardo Retamales Castelletto.

Jefe Sección Hematología e Inmunohematología. Subdepartamento Enfermedades No Transmisibles. Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia. Instituto de Salud Pública de Chile.

BQ. Carolina Valenzuela Barros.

Jefe Sección Inmunología. Subdepartamento Enfermedades No Transmisibles. Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia. Instituto de Salud Pública de Chile.

REVISORES INTERNOS

Dra. Verónica Ramírez Muñoz.

Jefe Subdepartamento Coordinación Externa. Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia. Instituto de Salud Pública de Chile.

REVISORES EXTERNOS

Representantes Sociedad Médica de Laboratorio Clínico:

Dra. Ana María Guzmán Durán.

Dra. María Jesús Vial Covarrubias.

Dra. Carolina Prieto Castillo.

COMITÉ EDITORIAL

TM. Mitzy Celis Morales.

Jefe Sección Coordinación de Redes de Laboratorios. Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia. Instituto de Salud Pública de Chile.

RECOMENDACIONES PARA EL ANÁLISIS DE LÍQUIDOS BIOLÓGICOS

INDICE DE CONTENIDOS

	página
1.- RESUMEN	4
2.- ALCANCE	4
3.- INTRODUCCIÓN	4
4.- DESARROLLO	4
4.1.- LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO	4
4.2.- LÍQUIDO SINOVIAL	13
4.3.- LÍQUIDOS DE CAVIDADES SEROSAS	18
4.4.- LÍQUIDO AMNIÓTICO	23
5.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1.- RESUMEN

Se seleccionaron los líquidos biológicos de mayor interés desde el punto de vista del laboratorio clínico, en los cuales se pueden llevar a cabo análisis que contribuyen al diagnóstico y evaluación de diversas patologías. En la mayoría de los casos se seleccionaron algunas metodologías que pueden efectuarse en laboratorios con infraestructura básica.

Con esto se espera contribuir al estudio de los líquidos biológicos seleccionados y proporcionar algunas herramientas de interés para su adecuada clasificación y análisis.

2.- ALCANCE

Este documento consolida los exámenes realizados más frecuentemente en el laboratorio clínico en muestras de líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, líquido de cavidades serosas (pleural, pericárdico y peritoneal) y líquido sinovial.

Contiene recomendaciones para los laboratorios clínicos que realizan análisis químico y celular de líquidos biológicos, contribuyendo a la estandarización, y proporcionando información relevante sobre valores de referencia, correcta manipulación, transporte y análisis.

En este documento, no se considera el análisis microbiológico de los líquidos, donde las condiciones y procesos analíticos asociados pueden ser diferentes.

3.- INTRODUCCIÓN

Los líquidos biológicos, al igual que el plasma, contienen diversos constituyentes químicos y celulares que interactúan dinámicamente para mantener el equilibrio corporal. La concentración de algunos analitos es similar a la plasmática, al igual que la actividad enzimática; sin embargo en otros, los constituyentes presentan sus propios niveles que los caracterizan, como por ejemplo en el caso del líquido cefalorraquídeo en su contenido proteico.

Lo anterior sumado a la valiosa información respecto de su aspecto, color concentración de analitos y relación del contenido proteico y otros analitos respecto del contenido plasmático, permiten clasificarlos como normales o patológicos y extraer de su estudio información relevante para el apoyo clínico.

4.- DESARROLLO

Este documento no considera el análisis microbiológico de los líquidos, donde las condiciones y procesos analíticos asociados puedan ser diferentes.

4.1.- LÍQUIDO CEFALORRAQUIDEO (LCR)

Fisiología y composición

El LCR es un líquido que baña el encéfalo y la médula espinal. Circula por el espacio subaracnoideo, los ventrículos cerebrales y el canal epidurario. En el adulto el volumen total oscila entre 90 a 150 mL y en recién nacidos varía entre 10 a 60 mL.

El LCR es un amortiguador mecánico que protege de traumatismos, regula el volumen de los contenidos intracraneales, es un medio nutriente del sistema nervioso central y es vía de excreción para productos metabólicos del sistema nervioso central.

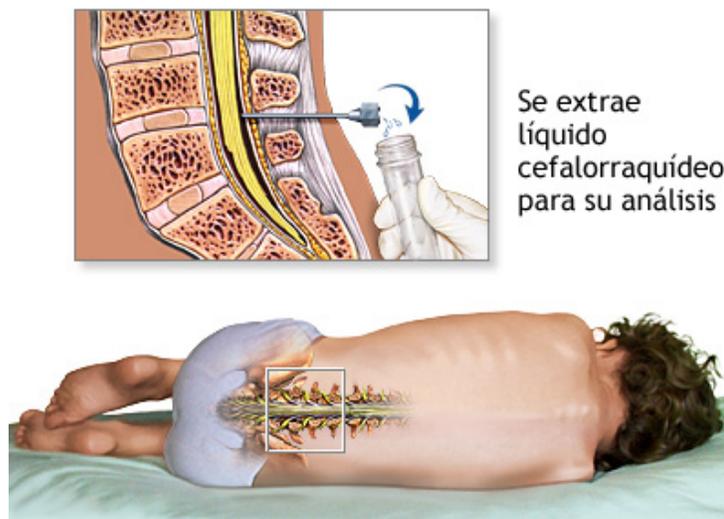
El LCR se forma a partir del plasma por filtración selectiva, por la presión hidrostática y la secreción por

transporte activo, otorgándole una composición química distinta a un ultrafiltrado plasmático. Existe por tanto un transporte activo entre la sangre, LCR y cerebro, lo que da lugar a que existan concentraciones diferentes de sustancias en cada lugar. Los electrolitos como el sodio, magnesio y cloruro están más concentrados en el LCR que en el plasma, mientras que el bicarbonato, glucosa y urea están menos concentrados. Por otra parte, las proteínas solo pasan al LCR en cantidades muy pequeñas.

Numerosas enfermedades que alteran la barrera hematoencefálica cambian la composición del LCR, por ello es importante su estudio y con frecuencia determinante en el diagnóstico de infecciones meníngeas, carcinomatosis y hemorragias. También es útil en las enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central o periférico.

Figura N°1

Punción Lumbar.



Fuente: www.nlm.nih.gov

Toma de muestra

El LCR normal es un líquido claro descrito como “agua de roca”, lo que significa que es totalmente transparente, como agua pura. La presión del LCR en adultos es de 90 – 180 mmHg y en niños entre 10 – 100 mmHg, de manera que de la punción sale gota a gota. Es seguro obtener hasta 20 mL en un adulto si la presión es normal. En casos de hipertensión, que se puede inferir durante el procedimiento de punción, es mejor obtener menor volumen, hasta 2 mL.

El LCR se recolecta rutinariamente por punción lumbar entre la tercera y cuarta vértebra lumbar, o entre la cuarta y quinta vértebra lumbar, con el paciente sentado o acostado, como se esquematiza en la Figura N°1, corresponde a un procedimiento estrictamente médico, previa evaluación clínica para descartar hipertensión endocraneana. Se utiliza una técnica aséptica que prevenga la introducción de infección y daño al tejido neural.

Se recomienda recolectarlo (aproximadamente 20 mL) en cuatro tubos estériles, provistos de tapas herméticas, el primero de los cuales es para exámenes químicos y serológicos, el segundo y el tercero para pruebas microbiológicas y estudios moleculares para agentes infecciosos y el cuarto para recuento de células sanguíneas (en caso necesario agregar un quinto tubo para búsqueda de células malignas). Idealmente los tubos deben ser de plástico (polipropileno) para evitar adherencias de las células de la muestra al vidrio del tubo.

Conservación y transporte

Una vez obtenido el LCR debe ser analizado lo más pronto posible, en caso contrario se debe conservar refrigerado para el recuento celular y congelado para las pruebas químicas y serológicas. Si se requiere de exámenes adicionales, cuidar condiciones especiales para almacenamiento de acuerdo a naturaleza del examen.

Todas las muestras de LCR deben manipularse con las mismas medidas de bioseguridad que para el manejo de otras muestras biológicas adoptadas en el laboratorio, considerándolas como potencialmente infecciosas.

ANÁLISIS DE LCR

A. Examen macroscópico

Aspecto

El aspecto normal del LCR es claro y cristalino. Esta apariencia puede variar, dependiendo de algunas patologías, proporcionando valiosa información sobre la significancia clínica, por ejemplo, un líquido turbio o de aspecto lechoso, puede indicar un incremento del contenido proteico o lipídico, pero también ser indicativo de infección por la presencia de glóbulos blancos. Un líquido sanguinolento puede ser indicativo de hemorragia o de punción traumática.

Un líquido xantocrómico, término utilizado para describir el LCR con un sobrenadante rosado, anaranjado o de color amarillo, es indicativo de la presencia de productos de la degradación de glóbulos rojos, dependiendo de la cantidad de éstos presentes en el LCR y el tiempo que han permanecido en él. El color amarillo da cuenta de una pequeña cantidad de oxihemoglobina; el anaranjado es producto de una intensa hemólisis y el amarillo, producto de la conversión de la oxihemoglobina a bilirrubina no conjugada. Otras causas de xantocromía pueden ser debido a elevados niveles séricos de bilirrubina, carotenos, incremento de concentración proteica y melatonina (metástasis cerebral de melanoma).

Dependiendo de su aspecto, el LCR se puede informar como: Normal, con xantocromía, hemolizado o con turbidez.

B. Examen Microscópico

El LCR normal no contiene glóbulos rojos. Si están presentes puede ser producto de una punción traumática, además el número de glóbulos rojos va disminuyendo desde el primer a tercer tubo colectado. En el caso de hallazgo de glóbulos rojos fantasmas, corresponde a un cuadro vascular anterior.

El estudio microscópico del líquido cefalorraquídeo debe ser analizado, a petición del clínico, para la búsqueda cualitativa o cuantitativa de células hematológicas o células malignas.

La primera determinación a realizar es el recuento celular, así el laboratorio determinará cuantos leucocitos se encuentran por unidad de volumen (mm^3 o μL).

El recuento de leucocitos en el LCR es muy bajo, de hecho su análisis se puede realizar en forma manual o en equipo automatizado validado para líquidos biológicos. Un aumento de leucocitos puede ocurrir en infecciones (virales, bacterianas, micóticas y parasitarias), alergias, leucemia, esclerosis múltiple, hemorragia, traumatismo, encefalitis, y en síndrome de Guillain-Barré.

Tabla N° 1:*Células predominantes en el LCR*

TIPO DE CÉLULA	IMPORTANCIA CLÍNICA PRINCIPAL	HALLAZGOS MICROSCÓPICOS
Linfocitos	Normal. Meningitis viral, tuberculosa y micótica. Esclerosis múltiple. Enfermedad degenerativa y enfermedades inflamatorias (sarcaidosis, arteritis, etc.).	Pueden encontrarse todos los estados de desarrollo.
Neutrófilos	Meningitis bacteriana. Casos tempranos de meningitis viral, tuberculosa y micótica. Hemorragia cerebral.	Los gránulos pueden ser menos prominentes que en sangre. Las células se desintegran con rapidez.
Monocitos	Normal. Meningitis viral, tuberculosa y micótica. Esclerosis múltiple.	Se encuentran mezclados con linfocitos.
Macrófagos	Eritrocitos en el líquido espinal. Medio de contraste.	Pueden contener eritrocitos fagocitados que aparecen como vacuolas vacías fantasma, gránulos de hemosiderina y cristales de hematoidina.
Formas blásticas	Leucemia aguda.	Linfoblastos, mieloblastos o monoblastos.
Células de linfoma	Linfomas diseminados.	Se asemejan a linfocitos con núcleos hendidos.
Plasmocitos	Esclerosis múltiple. Reacciones linfocíticas. Infección (viral, TBC, parásitos).	Se observan formas tradicionales y clásicas.
Células de epéndimo, coroides y fusiformes	Procedimientos diagnósticos.	Se observan en grupos con núcleos y paredes celulares bien diferenciados.
Células malignas	Carcinomas metastásicos. Carcinoma primario del sistema nervioso central.	Se observan en grupos con fusión de los bordes celulares y los núcleos.

Referencia: "Análisis de Orina y de los Líquidos Corporales", Strasinger – Di Lorenzo, 5ª Edición, Editorial Médica Panamericana, Pág. 186.

Procedimiento para recuento celular en forma manual:

1. Homogenice el líquido cefalorraquídeo mezclando suavemente por inversión el tubo que contiene la muestra para suspender las células sedimentadas. La agitación vigorosa puede destruir las células y afectar el recuento celular.
2. Use una pipeta para transferir líquido cefalorraquídeo a la cámara de Neubauer, Figura N°2. Llene el espacio entre el cubre-objeto y la cámara de recuento de glóbulos evitando las burbujas de aire. Cargue ambos lados de la cámara.
3. Mantenga la cámara de Neubauer en una cápsula de Petri con papel filtro húmedo por 5 minutos hasta que los leucocitos sedimenten.
4. Coloque la cámara de Neubauer en la platina del microscopio y fíjela con las abrazaderas. Use objetivo 10x de aumento para visualizar el área de lectura. Ajuste la iluminación y el condensador para obtener un mejor contraste celular.
5. Constate que la celularidad es semejante en ambos lados de la cámara. Cualquier discordancia importante o signo de desecación invalida el recuento.

Recomendaciones para el recuento:

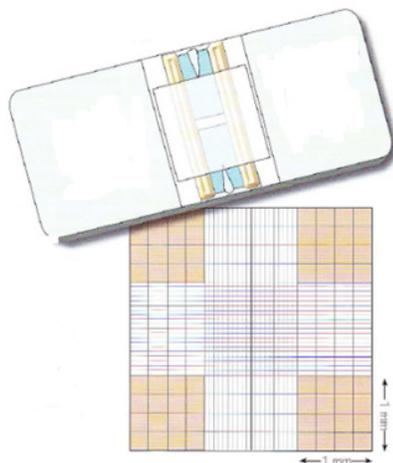
1. < 200 en los 9 cuadrados: contar toda el área (9 mm²).
2. > 200 en los 9 cuadrados: contar las 4 esquinas (4 mm²).
3. > 200 en 1 cuadrado: contar 5 cuadrados del cuadrado central (0,2 mm²).
4. Muestras diluidas: contar mínimo 200 células.

Las dimensiones de la Cámara de Neubauer son las siguientes:

$$\left. \begin{array}{l} 1 \text{ mm de longitud} \\ 1 \text{ mm de ancho} \\ 0.1 \text{ mm de profundidad} \end{array} \right\} 1 \times 1 \times 0,1 = 0,1 \text{ mm}^3$$

Figura N°2:

Cámara de recuento Neubauer



Fórmula diferencial

Se debe evitar la clasificación simple en porcentaje de mononucleares y polinucleares.

La fórmula diferencial de leucocitos ayuda a establecer la línea celular predominante. Es el caso en que la infección viral se asocia con aumento de linfocitos, y las infecciones bacterianas y fúngicas se asocian con un aumento de neutrófilos. La fórmula diferencial también puede revelar eosinófilos que se asocian a alergias; macrófagos con bacterias fagocitadas (indicando meningitis).

Tinción de May Grünwald – Giemsa

1. Centrifugar la muestra (volumen relativo de 0,5 mL) de LCR a 1.000 rpm por 4 minutos. Separar el sobrenadante dejando una cantidad suficiente para reconstituir el sedimento y realizar la extensión, dejar secar.
2. Usar la tinción de May Grünwald-Giemsa propia del hemograma pero con Giemsa diluido entre el 1 y 2%, en el caso que tenga una alta densidad celular se puede reducir el tiempo de Giemsa o usar la técnica sin modificaciones.
3. Realice la lectura con lente de inmersión (100 x) diferenciando las células de acuerdo al hallazgo de los leucocitos encontrados. Exprese cada tipo celular en porcentaje.

Informar:

Células hematopoyéticas: neutrófilos (segmentados y baciliformes), granulocitos inmaduros (metamielocitos, mielocitos y promielocitos), linfocitos variantes de linfocitos (reactivos), monocitos / macrófagos, eosinófilos, basófilos, células plasmáticas, eritroblastos.

Células tumorales o blastos.

Células epiteliales de recubrimiento.

Otras células atípicas.

Para el recuento diferencial también es útil la citocentrifugación, con la cual se puede disminuir significativamente el volumen de LCR del orden de 0,1 mL y tiene la ventaja de distribuir los elementos de la muestra en una monocapa, permitiendo una mejor observación.

Para identificación bacteriana, es muy importante realizar la tinción Gram para análisis microbiológico.

Tabla N°2:

Valores de referencia del LCR (análisis celular)

Células	Recién nacidos	0 - 1 mes	2 meses – 16 años	Adultos
Eritrocitos	0 – 50 / μ L	0 – 27 / μ L	0 – 7 / μ L	0 – 5 / μ L
Leucocitos				0 – 5 / μ L

Recuento diferencial	Recién nacidos	Adultos
Linfocitos	2 – 38 %	6 – 99 %
Monocitos	50 – 94 %	3 – 37 %
Histiocitos	1 – 9 %	Raros
Neutrófilos	0 – 8 %	0 – 2 %
Células neuroectodérmicas	Raras	Raras

Referencia: CLSI. *Body Fluid Analysis for Cellular Composition; Approved Guideline. Document H-56-A. Vol. 26 N° 26. June 2006.*

C. Exámenes químicos

Proteínas

La prueba más frecuente efectuada al LCR es la determinación de proteínas. El contenido proteico normal del LCR en adultos es de alrededor de 15 a 40 mg/dL, siendo un poco superior en niños y ancianos. Las principales proteínas presentes en el LCR son la albúmina, con alrededor de 15,5 mg/dL, prealbúmina 1,7 mg/dL, transferrina 1,4 mg/dL, inmunoglobulina G 1,2 mg/dL, inmunoglobulina A 0,13 mg/dL y ceruloplasmina 0,1 mg/dL.

Un incremento del contenido proteico del LCR es indicativo de un daño de la barrera hematoencefálica, provocada por meningitis, hemorragias y diversos desórdenes neurológicos, dentro de los más importantes.

Los métodos rutinarios más frecuentes para cuantificar el contenido proteico del LCR son los métodos turbidimétricos y nefelométricos mediante sueros específicos en equipos automatizados, además son los más recomendables por su buena precisión, utilización de escasa cantidad de muestra y manejo de un adecuado control de calidad interno. También podrían usarse otras metodologías como cuantificación de proteínas, por el método de precipitación de ácido sulfosalicílico o tricloroacético (TCA). Este último es más recomendado por precipitar tanto albúmina como globulinas. La calibración debe prepararse en base a patrones con una mezcla de albúmina y globulinas.

Otros métodos disponibles para cuantificar proteínas en LCR son el método con tinción de azul brillante de Coomassie G250 y los disponibles para analizadores químicos con bajos niveles proteicos como el método cloruro de benzetonio.

Determinación de fracciones proteicas

El diagnóstico de desórdenes neurológicos asociados con un contenido anormal de proteínas en el LCR requiere la medición de fracciones proteicas del LCR, las cuales estarán presentes en forma proporcional al daño de la barrera hematoencefálica. Enfermedades como la esclerosis múltiple y otras que estimulan las células inmunocompetentes en el sistema nervioso central (SNC) incrementarán el nivel de inmunoglobulina G (IgG) en el LCR.

Para evaluar la integridad de la barrera hematoencefálica se determina el índice de albúmina, para lo cual se divide el contenido de albúmina del LCR, expresada en mg/dL versus el contenido de albúmina sérica, expresada en g/dL:

$$\text{Índice de albúmina} = \frac{\text{albúmina LCR (mg/dL)}}{\text{albúmina sérica (g/dL)}}$$

Un índice menor de 9 representa una barrera intacta. El índice se incrementa en forma proporcional al daño de la barrera.

También se puede calcular el índice IgG para medir la síntesis de IgG dentro del SNC:

$$\text{Índice de IgG} = \frac{\text{IgG LCR (mg/dL) / IgG sérica (g/dL)}}{\text{albúmina LCR (mg/dL) / albúmina sérica (g/dL)}}$$

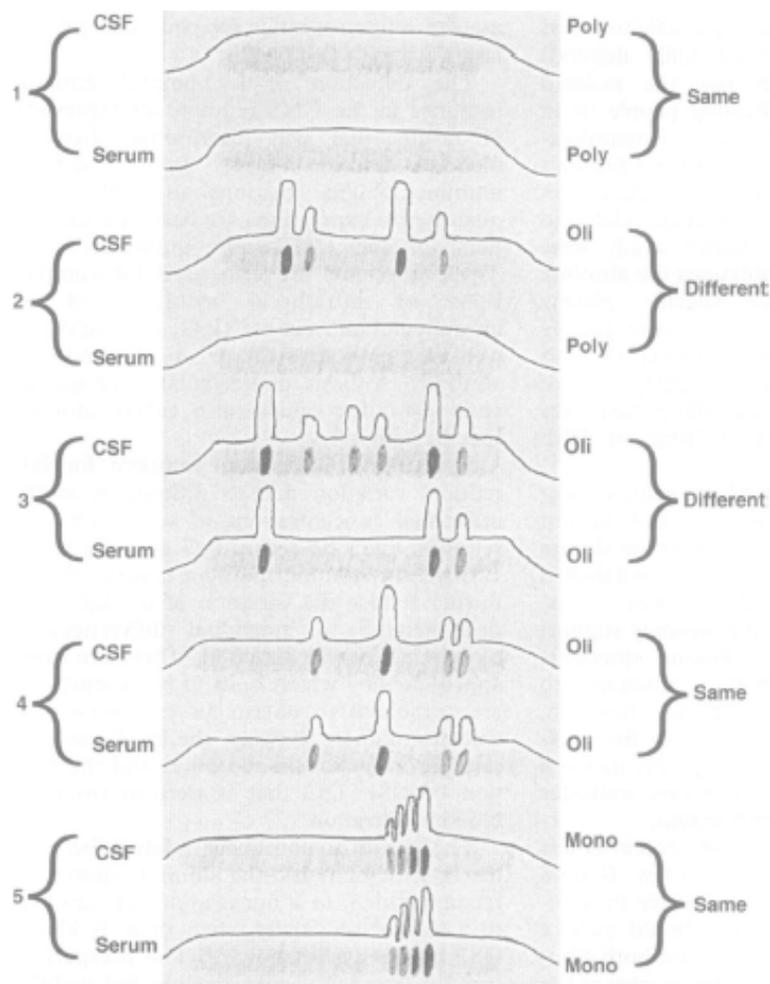
La electroforesis en LCR, acompañada simultáneamente de una electroforesis de proteínas en suero, ayuda al hallazgo de bandas oligoclonales y su interpretación, es decir lograr diferenciar si el aumento se debe a una respuesta inmune sólo a nivel de SNC, si es una patología sistémica con afectación de SNC, si es una inflamación sistémica generalmente infecciosa o si es por una gammopatía monoclonal.

La electroforesis con detección por tinción de plata fue ampliamente usada, sin embargo su interpretación es más difícil, debido a los patrones obtenidos. Hoy se usa preferentemente isoelectroenfoque, con detección de bandas precipitantes de producto enzimático, luego de transferir el gel a nitrocelulosa. Este método permite obtener imágenes más limpias que favorecen la interpretación de patrones asociados a bandas oligoclonales, como se observa en la figura N°3:

- 1) Patrón normal,
- 2) Esclerosis múltiple,
- 3) Esclerosis múltiple e inflamación del cerebro en enfermedad sistémica,
- 4) Inflamación sistémica,
- 5) Mieloma ó Gammopatía monoclonal.

Fig. N° 3.

Patrones típicos en isoelectroenfoque



Referencia: Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry 1994, 57: 897-902

Glucosa

La concentración de glucosa en el LCR es el resultado de un proceso dinámico de equilibrio con la glucosa plasmática a través de transporte activo en las células endoteliales y simple difusión a través de un gradiente de concentración entre el plasma y el LCR. El contenido de glucosa en el LCR es aproximadamente un 60 a 70% del contenido plasmático, alrededor de 65 mg/dL. Para una evaluación confiable de glucosa en el LCR se debe medir en paralelo la glucosa plasmática. Para su análisis pueden utilizarse los mismos métodos analíticos empleados para medir glucosa sanguínea, teniendo presente que debido a la glicolisis en LCR se debe efectuar el análisis en forma inmediata.

Concentraciones elevadas de glucosa en el LCR son siempre consecuencia de concentraciones elevadas en plasma. Niveles bajos de glucosa en el LCR pueden ser de considerable valor diagnóstico en la determinación del agente causal en meningitis. Los hallazgos de bajos niveles de glucosa en LCR, acompañado de un incremento en el recuento de leucocitos y un alto porcentaje de neutrófilos, son indicativos de meningitis bacteriana. Si los leucocitos predominantes son linfocitos en lugar de neutrófilos, se sospecha de una meningitis tuberculosa. También pueden producir disminución de glucosa en LCR tumores, sarcoidosis, cisticercosis y otros parásitos, sífilis meníngeas, entre otras. Por otra parte, si los valores de glucosa en el LCR son normales, con incremento del número de linfocitos, el diagnóstico está a favor de una meningitis viral. Estos patrones clásicos pueden no estar presentes en todos los casos de meningitis, pero cuando lo están pueden ser de utilidad.

Lactato

Los niveles normales de lactato en el LCR son de 10 a 22 mg/dL y su concentración no está relacionada con la concentración plasmática. Los incrementos de niveles de lactato en el LCR son el resultado del metabolismo anaeróbico al interior del SNC a causa de hipoxia tisular u oxigenación disminuida a nivel cerebral. Cualquier condición que disminuya el transporte de oxígeno hacia el SNC incrementará los niveles de lactato en el LCR.

Entre las numerosas condiciones que provocan altos niveles de lactato a nivel del LCR se encuentran: baja presión arterial de oxígeno, infarto cerebral, arteriosclerosis cerebral, hemorragia intracraneal, hidrocefalias, daño cerebral traumático, edema cerebral y meningitis.

La determinación de lactato puede ayudar en la diferenciación de meningitis causada por bacterias y por virus. En la meningitis viral, los niveles de lactato raramente exceden los 25 a 30 mg/dL, en contraste, otras formas de meningitis, como las de origen bacteriano, generalmente producen niveles de lactato en el LCR mayor de 35 mg/dL.

Los incrementos de lactato en el LCR están estrechamente asociados con bajos niveles de glucosa en el LCR y los resultados combinados de ambos parámetros pueden ser un mejor indicador diagnóstico para meningitis bacteriana, que en forma aislada.

Glutamina

La glutamina se forma a partir de amoníaco y alfa-cetoglutarato en las células cerebrales, como medida de eliminación del amoníaco, producto de desecho tóxico metabólico. Concentraciones elevadas de glutamina se asocian a trastornos hepáticos que aumentan la concentración de amoníaco en sangre y en el LCR.

La medición de glutamina aporta mejor información que la medición de amoníaco, debido a su mayor estabilidad. Los valores normales de glutamina están entre 8 y 18 mg/dL, y es muy frecuente que los pacientes presenten alteraciones de conciencia con valores mayores de 35 mg/dL.

Tabla N° 3:

Valores de referencia del LCR (para algunos analitos)

ANALITO	mg/dL
Albúmina	17,7 – 25,1 (*)
Proteínas totales	15 – 40 (*)
Glucosa	60 – 80 (niños) (*) 40 – 70 (adultos) (*)
Lactato	10 – 20 (**)

Referencias:

(*) Tietz Textbook Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, fifth edition, Elsevier, 2012.

(**) www.aruplab.com.

4.2.- LÍQUIDO SINOVIAL

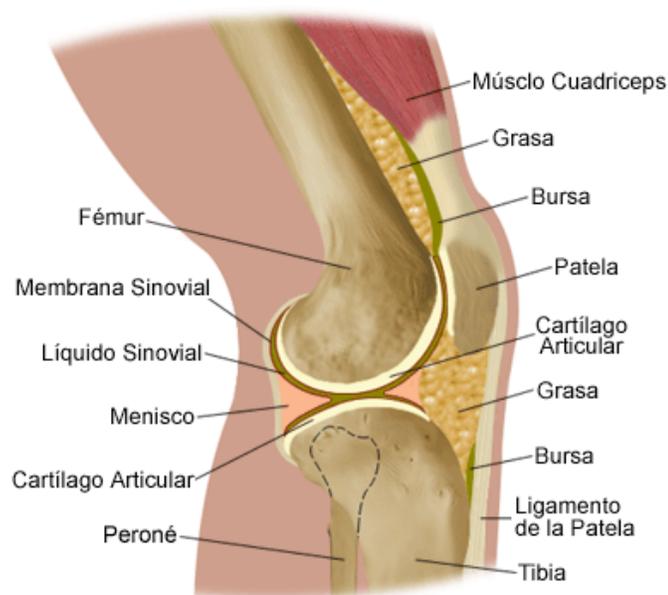
Fisiología y composición

Es un líquido viscoso que llena las cavidades articulares y actúa como lubricante manteniendo al mínimo la fricción entre los huesos. Este líquido también suministra un medio nutricional para el cartílago y ayuda a disminuir el impacto de compresión durante las actividades tales como caminar y saltar, Figura N°4.

El líquido sinovial es un ultrafiltrado del plasma con la misma concentración iónica, contiene pocas proteínas y células pero es rico en ácido hialurónico, producido por células sinoviales, responsable de su viscosidad. Su análisis en el laboratorio ayuda a determinar el origen patológico de diversas enfermedades que provocan inflamación de las articulaciones, ayudando a diferenciar las artritis infecciosas de las no infecciosas.

Figura N°4:

Esquema de rodilla humana



Referencia: <http://www.mejorconsalud.com>

Toma de muestra

La toma de muestra de líquido sinovial es un procedimiento médico que se realiza por punción articular con jeringa (artrocentesis). La cantidad de líquido presente variará dependiendo de la articulación y de la cantidad de líquido acumulado. Por ejemplo en la articulación de la rodilla la cantidad normal de líquido sinovial es de alrededor de 3,5 mL, el cual puede incrementarse hasta unos 25 mL en una inflamación. En algunos casos solo se pueden obtener algunas gotas, las que sirven para un análisis microscópico o bacteriológico.

Normalmente el líquido sinovial no coagula; sin embargo, producto de algunas enfermedades, puede contener fibrinógeno y coagulará. Por lo anterior se recomienda recolectarlo con jeringas heparinizadas, con heparina sódica. Cuando se obtiene suficiente cantidad, se debería distribuir en tres tubos, uno estéril y heparinado para el laboratorio de microbiología, un tubo con EDTA para análisis celular y en un tubo sin anti-coagulante para pruebas químicas. Estos últimos se deben centrifugar tan pronto como sea posible y separar el sobrenadante para prevenir interferencias por elementos celulares en las pruebas química y serológicas.

ANÁLISIS DE LÍQUIDO SINOVIAL

A. Examen macroscópico

Aspecto y viscosidad

El aspecto normal del líquido sinovial es claro y de color amarillo pálido. Cuando hay procesos inflamatorios adquiere un color amarillo profundo y puede tener un tinte de color verdoso en infecciones bacterianas. La presencia de sangre en el líquido sinovial puede provenir de una artritis hemorrágica o de aspiración traumática. Esto último puede corroborarse al observar una distribución irregular de sangre en el aspirado.

La turbidez se asocia frecuentemente con la presencia de glóbulos blancos; sin embargo, restos de células sinoviales y fibrina también producen turbidez. El líquido también puede aparecer lechoso en presencia de cristales.

La viscosidad del líquido sinovial es similar a la de la clara de huevo y está dada por la polimerización del ácido hialurónico, la cual es esencial para la lubricación de las articulaciones. La artritis afecta tanto la producción del ácido hialurónico como su polimerización, lo cual produce una disminución de su viscosidad. Una forma práctica y sencilla de medir su viscosidad es observar su capacidad de formar una hebra desde la punta de la jeringa, lo normal es obtener una hebra de 4 a 6 cm. A esta propiedad se le conoce como filancia. También se puede colocar una gota de líquido sobre un portaobjeto y con un aplicador de madera levantarla lentamente.

Se puede estimar el grado de polimerización del ácido hialurónico mediante la prueba de Ropes o coágulo de mucina, con una solución del 2 al 5 por ciento de ácido acético. Normalmente se forma un coágulo del líquido sinovial, rodeado de un líquido claro. A medida que la capacidad del ácido hialurónico para polimerizar disminuye, se forma un coágulo menos consistente y el líquido a su alrededor incrementa en turbidez. Esta prueba se informa en términos de la consistencia del coágulo como coágulo sólido, débil, desmenuzable y sin coágulo. Esta prueba no se lleva a cabo en forma rutinaria, debido a que en todas las formas de artritis decrece la viscosidad del líquido sinovial, obteniéndose una pequeña información diagnóstica.

Desde el punto de vista del análisis macroscópico se debe informar:

- Color
- Volumen
- Claridad
- Viscosidad

Tabla N° 4:

Valores de referencia del líquido sinovial

	NORMAL	INFLAMATORIO	SÉPTICO
Volumen (mL)	< 3,5	> 3,5	> 3,5
Viscosidad (cm)*	3 a 6	< 3	< 3
Color	Amarillo paja	Amarillo opaco	Lechoso
Leucocitos/ μ L	50 – 2.000	2.000 – 75.000	> 75.000

(*): Filancia

Referencia: *Reumatol Clin.* 2010; 6(6): 316 – 321

B. Examen microscópico

El recuento de leucocitos debe ser realizado de inmediato o antes de una hora, luego de la artrocentesis, debido a la labilidad de las células en este tipo de muestra. Se utiliza la cámara Neubauer ya explicitada en el análisis de LCR, o utilizando contadores automatizados, aunque existe riesgo de coágulos en el equipo. Cuando la celularidad es alta, se debe diluir el líquido con suero fisiológico. Si la muestra es hemorrágica puede ser necesaria la lisis de eritrocitos para el recuento celular, para ello se diluirá la muestra con suero salino hipotónico (0,3 mol/L). No se recomienda el Hayem B como lisante de glóbulos rojos, ya que contiene ácido acético, el cual precipita el ácido hialurónico e impide el recuento de leucocitos.

El recuento de leucocitos permite clasificar el líquido sinovial en diferentes grupos:

1. Líquido sinovial no patológico: hasta 200 leucocitos / μ L.
2. Líquido sinovial patológico desagregado por grupos (Tabla N°4).
3. Líquido sinovial de origen hemorrágico: el recuento de leucocitos es bajo y se asocia a traumatismo, fractura, tumor y prótesis y trastornos de la hemostasia como la hemofilia.

Tabla N°5:

Trastornos articulares y hallazgos de laboratorio de líquido sinovial

Grupo de clasificación	Importancia patológica	Hallazgos de laboratorio
1.No inflamatorio	Trastornos articulares degenerativos, artrosis.	Líquido claro y amarillo Buena viscosidad Leucocitos < 1.000/μL Neutrófilos < 30 % Glucosa normal (glicemia)
2. Inflamatorio Origen: Inmunitario	Trastornos inmunitarios, artritis reumatoide, lupus eritematoso, esclerodermia, polimiositis, espondilitis anquilosante, fiebre reumática y artritis de Lyme.	Líquido turbio y amarillo Escasa viscosidad Leucocitos 2.000-75.000/μL Neutrófilos > 50% Concentración disminuida de glucosa Presencia posible de autoanticuerpos
2. Inflamatorio Origen: inducido por cristales	Gota inducida por cristales y pseudogota.	Líquido turbio o lechoso Viscosidad baja Leucocitos hasta 100.000/μL Neutrófilos < 70% Concentración disminuida de glucosa Presencia de cristales
3. Séptico	Infección microbiana.	Líquido turbio, amarillo verdoso Viscosidad variable Leucocitos 50.000-100.000/μL Neutrófilos > 75% Concentración disminuida de glucosa Tinción de Gram y cultivo positivos
4. Hemorrágico	Lesión traumática, tumores, hemofilia, otros trastornos de la coagulación. Dosis excesivas de anticoagulante.	Líquido turbio, rojo Viscosidad baja Leucocitos iguales a los de sangre Neutrófilos iguales a los de sangre Concentración de glucosa normal

Referencia:

Análisis de orina y de los líquidos corporales, Strasinger – Di Lorenzo, 5ª Edición, Ed. Médica Panamericana, Pág. 218

Recuento diferencial

En forma rutinaria la tinción de May Gründwald-Giemsa es la seleccionada por su amplia aplicabilidad en los laboratorios clínicos. En el caso de muy baja celularidad se puede elegir una técnica con citocentrifugación.

El líquido sinovial contiene alrededor de un 20% de neutrófilos, por lo que la mayoría de las células corresponden a linfocitos y monocitos (macrófagos). En líquidos parcialmente inflamatorios predominan las células mononucleadas, como por ejemplo en la fase inicial de artritis reumatoide y artritis del lupus eritematoso sistémico. En fases de artritis progresivas se observa un predominio claro de neutrófilos, como también en la artritis bacteriana. La eosinofilia en el líquido sinovial es de baja frecuencia, aunque puede observarse especialmente en las artropatías asociadas a reacciones alérgicas, enfermedades parasitarias y carcinomas metastásicos.

Cristales en líquido sinovial

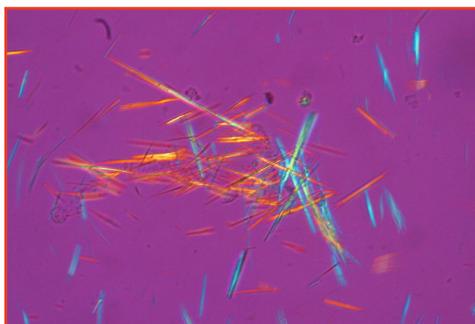
El examen microscópico del líquido sinovial es de importancia diagnóstica en la evaluación de la artritis por cristales. La formación de cristales en la articulación frecuentemente provoca una inflamación aguda, con aumento de leucocitos en líquido sinovial y sus causas incluyen desórdenes metabólicos, excreción renal disminuida, degeneración de cartílago y hueso e inyección de medicamentos intraarticulares como corticoides.

Los principales cristales encontrados en el líquido sinovial son los de urato monosódico (ácido úrico), en casos de gota, y pirofosfato cálcico, en pseudogota. Las causas más frecuentes de gota están dadas por el incremento del ácido úrico sérico debido a alteraciones metabólicas de los ácidos nucleicos asociadas a desordenes mieloproliferativos y disminución de la excreción renal. La pseudogota se asocia más a menudo con la artritis degenerativa, que provoca una calcificación del cartílago, y con desórdenes endocrinos que incrementan los niveles de calcio sérico.

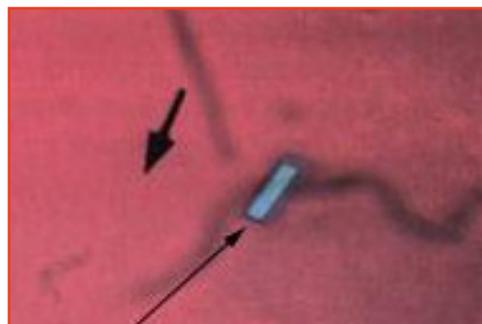
Otros cristales que pueden estar presentes en el líquido sinovial incluyen la hidroxiapatita (fosfato de calcio básico), asociados con inflamación sintomática aguda; cristales de colesterol, en líquidos inflamatorios y en líquidos que se drenan de bursas en pacientes con artritis reumatoide, lupus eritematoso generalizado y espondiloartropatías seronegativas; cristales de oxalato de calcio, casi exclusivamente en pacientes con daño renal y oxalosis; cristales de hematóidina, en pacientes con hemartrosis, como producto de degradación de la hemoglobina; cristales de lípidos (cruces de Malta), en pacientes con monoartritis aguda, poliartritis crónica y sinovitis villonodular pigmentada; cristales de Charcot-Leyden, poco comunes, se encuentran en pacientes con sinovitis eosinofílica y eosinofilia asociada a vasculitis.

Idealmente el examen microscópico debe efectuarse inmediatamente de recolectado el líquido sinovial, para asegurarse que los cristales no sean afectados por cambios de temperatura y pH. Tanto los cristales de urato monosódico como los de pirofosfato cálcico se encuentran extra e intracelularmente (neutrófilos); por lo tanto, el líquido debe examinarse antes de la desintegración de los leucocitos.

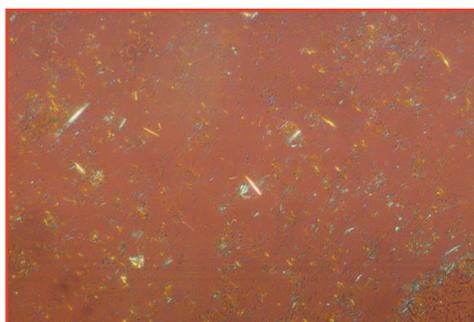
El examen microscópico del líquido sinovial debe efectuarse con microscopio de luz polarizada y luz polarizada compensada. Los cristales de urato monosódico son de aspecto de agujas y los de pirofosfato cálcico son rómbicos.



Cristales de ácido úrico birrefringentes con luz polarizada / eltamiz.com



Cristal de pirofosfato de calcio / basesmedica.cl



Cristales de urato monosódico extracelulares con forma de aguja y birrefringencia negativa con luz polarizada / reumatologíaclínica.org

C. Exámenes químicos

Debido a que el líquido sinovial es químicamente un ultrafiltrado del plasma, los valores de las pruebas químicas son similares a los valores séricos. Por lo tanto hay pocas pruebas de importancia del área química clínica. Lo más frecuentemente solicitado es la determinación de glucosa, porque sus valores decrecen significativamente en desordenes inflamatorios (grupo 1) o sépticos (grupo 2). Deben medirse simultáneamente los niveles de glucosa plasmática y en el líquido sinovial, preferentemente en pacientes con ayuno de 8 horas. Bajo estas condiciones el nivel de glucosa sinovial debiera ser unos 10 mg/dL inferior al de la glucosa plasmática. Para prevenir la glicolisis, los especímenes deben analizarse dentro de una hora de la toma de muestras.

Los niveles de lactato en el líquido sinovial proporcionan una rápida diferenciación entre artritis inflamatoria y séptica y no se requiere su medición plasmática. En artritis séptica los niveles de lactato del líquido sinovial son superiores a 250 mg/dL, pero también estos niveles pueden estar presentes en artritis reumatoide.

Otras pruebas químicas que pueden ser solicitadas en el líquido sinovial son proteínas totales y ácido úrico. Debido a que las grandes moléculas de proteínas no son filtradas a través de las membranas sinoviales, el líquido sinovial contiene menos de 3 g/dL de proteínas (aproximadamente un tercio del valor sérico). El nivel proteico se incrementa en los desórdenes inflamatorios y hemorrágicos; sin embargo, la medición de los niveles proteicos en el líquido sinovial no contribuye a la clasificación de estos desórdenes. Cuando no se puede demostrar la presencia de cristales en el líquido sinovial, los niveles elevados de ácido úrico se pueden usar para apoyar el diagnóstico de gota.

4.3.- LÍQUIDOS DE CAVIDADES SEROSAS

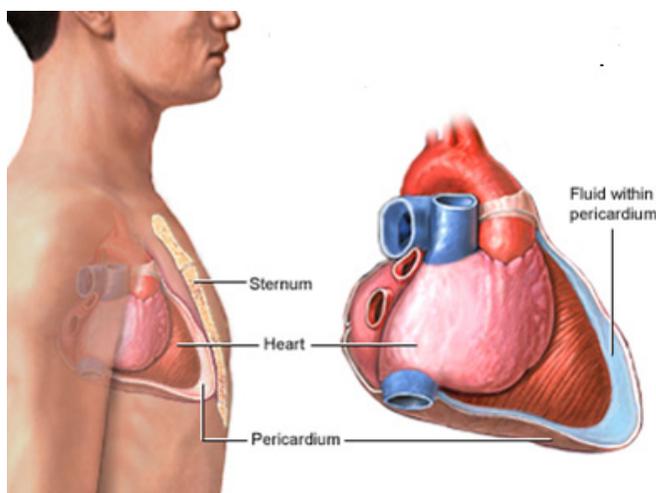
Fisiología y composición

Los líquidos de cavidades serosas derivan del plasma y se encuentran en las cavidades pleural, pericárdica y peritoneal.

Los procesos de formación de éstos líquidos son dinámicos y están controlados por la permeabilidad de los capilares en la membrana parietal, la presión hidrostática en estos capilares, la presión oncótica (o coloide osmótica) producida por las proteínas plasmáticas dentro de los capilares y la absorción de líquidos por el sistema linfático. La presión hidrostática de la sangre fuerza al plasma a ultrafiltrarse hacia las cavidades, mientras que las proteínas ejercen una presión inversa a esta filtración. La permeabilidad del endotelio capilar regula la velocidad de formación del ultrafiltrado y de su composición proteica. Si se incrementa la permeabilidad endotelial provoca un desplazamiento de las proteínas sanguíneas hacia las cavidades. Estos fluidos vasculares ricos en proteínas aumentarán la acumulación de líquido en las cavidades. Esta acumulación de líquido en las cavidades se denomina derrame e indica un proceso patológico.

Figura N°5:

Acumulación de líquido en el espacio pericárdico.



Toma de muestra

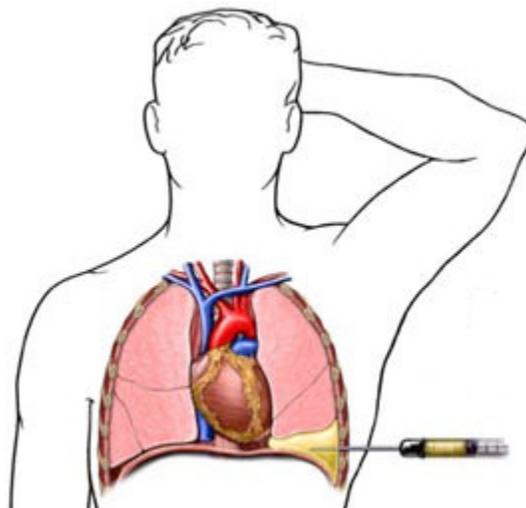
Se denomina paracentesis a la punción percutánea de las cavidades del cuerpo para la aspiración de líquidos. Otras denominaciones describen las punciones según el tipo de cavidad puncionada, por ejemplo, pericardiocentesis para la cavidad pericárdica, toracentesis para la cavidad pleural y paracentesis propiamente tal para la cavidad peritoneal. El término ascitis se refiere al aumento del líquido en la cavidad peritoneal.

La recolección de un líquido de derrame desde una cavidad del cuerpo es un procedimiento invasivo que debe ser ejecutada por un médico utilizando una técnica aséptica. A diferencia de la recolección del LCR y sinovial, los líquidos serosos pueden ser obtenidos en grandes volúmenes. Esto proporciona suficiente cantidad de líquido para el análisis y evita la necesidad de efectuar nuevas punciones, excepto cuando se requiere por propósitos terapéuticos.

Los líquidos de cavidades serosas deben transportarse al laboratorio tan pronto como sea posible después de ser obtenidos para eliminar potenciales cambios celulares y químicos. Normalmente, los líquidos serosos no contienen sangre ni fibrinógeno, pero por punciones traumáticas, pueden extraerse líquidos con sangre y coágulos. Para prevenir la formación de coágulos se recomienda utilizar tubos estériles con anticoagulantes, heparinizados, con EDTA, para exámenes microscópicos. Para exámenes químicos se utilizan tubos sin anticoagulantes, dado que estos exámenes pueden efectuarse en el sobrenadante de muestras coaguladas. Paralelamente a la paracentesis se debe extraer una muestra sanguínea para estudios de comparación.

Figura N°6:

Toma de muestra líquido pleural.



Fuente: wordpress.com

ANÁLISIS DE LÍQUIDOS SEROSOS

Transudados y Exudados

Clásicamente, según su contenido proteico, los líquidos serosos se diferencian en transudados y exudados. Esta distinción es fundamental para su clasificación etiopatogénica y para la selección de las magnitudes bioquímicas cuyo estudio aportará una mayor eficacia diagnóstica.

Los transudados son líquidos no inflamatorios que se originan por alteración de factores sistémicos que afectan a la formación o reabsorción del líquido (presión hidrostática o coloidosmótica). Frecuentemente están asociados con insuficiencia cardíaca congestiva, cirrosis hepática y síndrome nefrótico, los dos últimos se asocian con hipoproteinemia.

Los exudados son líquidos inflamatorios cuya formación depende de un aumento de la permeabilidad capilar debido a alteraciones que implican directamente a estructuras de la superficie de determinadas cavidades corporales (mesotelio, vasos linfáticos y capilares). Algunas infecciones pueden producir exudados, así como también, neoplasias, desordenes sistémicos, traumatismos o condiciones inflamatorias. Los exudados requieren un mayor número de pruebas de laboratorio que los transudados, tales como estudios microbiológicos o estudios citológicos.

La diferencia entre transudados y exudados se basa en niveles arbitrarios de decisión clínica que ha sido determinada empíricamente. Uno de los criterios ampliamente utilizados es el criterio de Light, publicado en el año 1972, el cual considera los niveles proteicos en el líquido pleural versus los niveles de proteínas en suero, al igual que los niveles de lactato deshidrogenasa (LDH) pleural versus LDH plasmática. Esto se describe más adelante, en la sección de exámenes químicos de los líquidos serosos.

A. Examen macroscópico

Aspecto

No hay disponibles valores de referencia para los líquidos pleurales, pericárdicos y peritoneales debido a que los volúmenes en condiciones normales son pequeños. Habitualmente se recolectan y categorizan como transudados y exudados. Los transudados son generalmente líquidos claros, de color amarillo pálido o amarillo, similar al suero. Debido a que no contienen fibrinógeno, no coagulan en forma espontánea. En contraste, los exudados generalmente coagulan, varían de color de amarillo, verde o rosado y pueden tener un brillo. Contienen fibrinógeno, por tanto requieren un anticoagulante al ser extraídos.

La turbidez del líquido pleural está relacionada con la presencia de leucocitos por infección bacteriana, tuberculosis o trastorno inmunitario como artritis reumatoidea. La acumulación de sangre en la cavidad pleural, denominado hemotórax, puede ser por traumatismo torácico, en pacientes con infarto pulmonar, cáncer pulmonar o pleural y tuberculosis.

El líquido pericárdico turbio se presenta en infecciones o en procesos malignos, en éste último caso suelen estar acompañados de filamentos de sangre. Los derrames sanguinolentos pueden ser producto de perforación cardíaca accidental y dosificación inadecuada de anticoagulantes.

El líquido peritoneal de exudados es turbio en infecciones bacterianas o micóticas. Su coloración es verdosa o castaño oscuro cuando hay presencia de bilis. Se observan filamentos de sangre en traumatismos, tuberculosis, procesos malignos y trastornos intestinales. Cuando hay bloqueos de vasos linfáticos o traumatismos, se puede presentar material quiloso o pseudoquiloso.

B. Examen microscópico

Debe realizarse al igual que en los demás líquidos biológicos con tinción de May Grünwald Giemsa, diferenciando todos los tipos celulares.

Las principales células del líquido pleural son los neutrófilos; asociados con neumonía, pancreatitis e infarto pulmonar; los linfocitos, asociados con tuberculosis, infecciones virales, trastornos autoinmunitarios y procesos malignos; las células mesoteliales, asociadas con tuberculosis cuando están disminuidas; los plasmocitos, en tuberculosis y células malignas en adenocarcinoma primario, microcítico y carcinoma metastásico.

Tabla N° 6:

Valores de referencia del líquido pleural (celularidad)

PARÁMETRO/ANALITO	VALORES DE REFERENCIA
Volumen	4 – 12 mL
Recuento de células nucleadas	1.395 – 3.734
Macrófagos	64 – 80 %
Linfocitos	18 – 36 %
Neutrófilos	0 – 1 %
Células mesoteliales	0 – 2 %

Referencia:

CLSI. *Body Fluid Analysis for Cellular Composition; Approved Guideline. Document H-56-A. Vol. 26 N° 26. June 2006.*

Es fundamental en el examen de los derrames serosos investigar la presencia de células malignas, las cuales suelen ser difíciles de diferenciar entre células mesoteliales y otras tisulares. Sus características distintivas son sus irregularidades nucleares y citoplasmáticas, textura nuclear, nucléolos hiperocrómicos y relación núcleo citoplasma anormal, presencia de multinucleolos, células mitóticas, canibalismo, gránulos citoplasmáticos, vacuolas, etc.

Los derrames pleurales malignos en su mayoría presentan células de adenocarcinomas grandes, irregulares, células de carcinoma microcítico, similares a linfocitos grandes y grupos de células metastásicas de carcinoma de mama.

C. Exámenes químicos

Cociente proteína total y cociente lactato deshidrogenasa (criterios de Light)

Las pruebas útiles para la clasificación de transudados y exudados son las mediciones simultáneas de proteína total (PT) y lactato deshidrogenasa (LDH), tanto en el suero como en el líquido seroso. A partir de estas mediciones se establecen cocientes de concentración de proteína y LDH:

$$\text{Cociente PT} = \frac{\text{PT del líquido}}{\text{PT en suero}}$$

$$\text{Cociente LDH} = \frac{\text{LDH del líquido}}{\text{LDH en suero}}$$

Estos cocientes proporcionan medios confiables para distinguir entre transudados y exudados. Si el cociente PT es < 0,5 y el cociente LDH es < 0,6, el líquido se clasifica como un transudado. En contraste, los exudados son aquellos líquidos con un cociente PT > 0,5 y un cociente LDH > 0,6.

En transudados el nivel de LDH es < 2/3 del nivel de LDH sérica y en exudados el nivel de LDH es > 2/3 de los niveles de LDH sérica.

Gradiente de albúmina plasmática-albúmina de líquido ascítico (GASA)

Cuando el líquido peritoneal excede de 25 mL y además aumenta progresivamente se denomina ascitis. La relación entre la concentración de albúmina en suero y la de albúmina en líquido ascítico proporciona una mejor clasificación diagnóstica de la ascitis que la concentración de proteínas, por lo que algunos expertos reemplazan los términos transudados y exudados en la descripción de la ascitis, por el de gradiente de albúmina elevado y gradiente de albúmina disminuido.

El gradiente de albúmina se obtiene sustrayendo la concentración de albúmina en líquido ascítico a la concentración de albúmina en suero. Para lo anterior, las muestras de suero y líquido ascítico deben obtenerse simultáneamente.

La utilidad del gradiente de albúmina se basa en el concepto de equilibrio oncótico-hidrostático. La diferencia entre albúmina sérica y en líquido ascítico es muy grande en pacientes con hipertensión portal. Si esta diferencia es mayor o igual a 1,1 g/dL, sugiere la presencia de hipertensión portal, como se puede encontrar en cirrosis hepática, metástasis hepáticas y síndrome nefrótico, enfermedad pancreática y otras. El gradiente de albúmina nos permite clasificar, con una eficacia del 95%, la ascitis como asociada o no a hipertensión portal. Los laboratorios deben informar el primer decimal.

Glucosa

La medición simultánea de glucosa sérica y en el líquido seroso tiene un valor limitado. Si en el líquido seroso la glucosa es inferior a 60 mg/dL o la diferencia entre glucosa sérica y glucosa del líquido seroso es superior a 30 mg/dL, se identifica un proceso exudativo. Solo tienen relevancia clínica los niveles bajos de glucosa ante la sospecha diagnóstica de artritis reumatoide.

Amilasa

La medición simultánea de amilasa en suero y líquido seroso es clínicamente de utilidad para líquido pleural y peritoneal, siendo un examen de rutina en muchos laboratorios. Un valor de amilasa en el líquido que excede el valor normal a nivel sérico, o es superior 1,5 a 3 veces, se considera como anormalmente aumentado. Estos niveles elevados de amilasa en los líquidos se presentan en derrames provocados por pancreatitis, ruptura esofágica, perforación gastroduodenal y neoplasias.

Triglicéridos

El nivel de los triglicéridos en líquidos serosos es de utilidad especialmente cuando estos son de aspecto lechoso o quiloso. Cuando los niveles de triglicéridos exceden los 110 mg/dL indican un derrame quiloso, mientras que si estos son inferiores a 60 mg/dL lo descartan. Si los niveles de triglicéridos están entre 60 y 110 mg/dL, se puede efectuar adicionalmente una electroforesis de lipoproteínas.

La presencia de quilomicrones identifica al derrame como quiloso, mientras que su ausencia la identifica como pseudoquiloso. El contenido de colesterol del derrame quiloso y pseudoquiloso es de utilidad clínica. La efusión quilosa se asocia con obstrucción o daño al sistema linfático. Neoplasias (por ejemplo linfoma), traumas, tuberculosis y procedimientos quirúrgicos a menudo provocan derrames quilosos; mientras que los pseudoquilosos se presentan más a menudo en inflamaciones crónicas como ocurre en artritis reumatoide.

pH

Las muestras de líquidos biológicos para las mediciones de pH deberían recolectarse y analizarse de manera idéntica a las muestras de sangre arterial para mediciones de pH y gases sanguíneos, con algunas excepciones clínicas especiales. Las muestras se recolectan anaeróbicamente y se mide el pH a 37°C.

En condiciones fisiológicas el líquido pleural tiene un pH sobre 7,50; por la mayor concentración de bicarbonato que en la sangre. En empiemas y artritis reumatoide el pH bajo es casi constante. Los mayores grados de acidez se encuentran en empiemas, en los cuales se puede alcanzar pH cercanos a 5,00. En éstos, el principal determinante de la acidez es la metabolización anaeróbica de la glucosa por gérmenes y leucocitos, siendo el grado de acidificación indicativo de la intensidad de la infección e inflamación.

Los líquidos pleurales con pH anormalmente bajos pueden ayudar a identificar pacientes con derrames paraneumónicos (exudados provocados por neumonía o abscesos pulmonares) que requieren un tratamiento agresivo. Interesa principalmente discriminar aquellos con pH inferiores a 7,30 para aplicar un adecuado tratamiento de antibióticos.

4.4.- LÍQUIDO AMNIÓTICO**Fisiología y composición**

El líquido amniótico es un líquido que rodea y protege al feto a través de su gestación dentro del saco amniótico. Cumple funciones de amortiguación, intercambio de sustancias bioquímicas y controla y regula la temperatura del feto.

Está compuesto por constituyentes celulares y numerosos componentes bioquímicos, tales como electrolitos, compuestos nitrogenados, proteínas, enzimas, lípidos y hormonas.

Su volumen aumenta progresivamente durante el embarazo, llegando a un nivel máximo de 1 litro aproximadamente durante el tercer trimestre y luego disminuye gradualmente previo al parto.

El análisis del líquido amniótico es de utilidad en la evaluación del “distress fetal” y maduración del feto.

Toma de muestra (amniocentesis)

El líquido amniótico se recolecta por punción aspirativa a través de la pared abdominal. Alternativamente puede hacerse a través de la vagina con la ayuda de una ecografía continua. Se prefiere la amniocentesis trans-abdominal, debido a que la vaginal puede contaminar el líquido con células vaginales y bacterias.

La recolección es realizada por un profesional competente y con técnica aséptica adecuada. Se extrae aproximadamente 10 a 20 mL de líquido con jeringa, generalmente 2 ó 3 tubos, dependiendo del tipo de exámenes a realizar (al menos uno sin anticoagulante para estudio físico-químico y uno con EDTA para estudio citológico).

Conservación y transporte

Inmediatamente de obtenido el líquido amniótico debe ser transferido a tubos o contenedores plásticos estériles, protegidos de la luz, para ser transportados al laboratorio. Se recomienda el uso de contenedores de color ámbar o protegerlos con papel de aluminio para prevenir la foto oxidación de la bilirrubina. El líquido se debe procesar con las medidas de bioseguridad establecidas por el laboratorio.

El transporte al laboratorio debe efectuarse tan pronto como sea posible. Las muestras para estudios de fosfolípidos deben transportarse refrigerados. La conservación a temperatura ambiente y sin centrifugar puede provocar una pérdida importante de fosfolípidos (lecitina y esfingomielina) debido al metabolismo

celular, por tanto todos los líquidos para análisis químicos deben ser centrifugados en forma inmediata. Si se almacenan por más de 24 horas, es necesario congelarlos.

La velocidad de centrifugación del líquido amniótico es dependiente del tipo de exámenes a efectuarse. Para la recuperación celular aproximadamente de 140 g, 500 g para fosfolípidos, mientras que para electroforesis de proteínas se deben centrifugar a 1500 g por 5 minutos.

Diferenciación de orina

Puede ser necesario diferenciar si una pérdida de líquido corresponde a líquido amniótico u orina, como ocurre en la sospecha de ruptura prematura de membrana o en caso de una punción accidental de la vejiga. La orina contiene alta concentración de creatinina y urea y esencialmente no contiene proteínas y glucosa. En contraste, el líquido amniótico contiene proteínas (aproximadamente 2 a 8 g/L) y glucosa. El líquido amniótico tiene concentración de creatinina similar a la del plasma, se incrementa de 2 a 3 veces aproximadamente a partir de la semana 37 de gestación. No obstante lo anterior, si la creatinina del líquido amniótico es mayor de 4 mg/dL, el líquido recolectado puede ser orina o líquido amniótico contaminado con orina. De la misma forma si una determinación con tira reactiva para orina es positiva para glucosa y proteína, el líquido es amniótico. En esta última situación, los resultados deben confirmarse con una medición de creatinina o urea dado que la diabetes y enfermedades renales pueden provocar la presencia de proteínas y glucosa en orina.

ANÁLISIS DE LÍQUIDO AMNIÓTICO

A. Examen macroscópico

Aspecto

El examen físico del líquido amniótico debe efectuarse inmediatamente de recibirse en el laboratorio, por inspección visual del color y turbidez. El líquido amniótico normal es incoloro o amarillo pálido. Una coloración amarilla o ámbar se asocia con la presencia de bilirrubina, mientras que un color verde indica la presencia de meconio, proveniente del feto, al término de gestación. La responsable de este color verde es la biliverdina.

La contaminación con sangre generará un color rosado a rojo del líquido amniótico. Se recomienda en este caso, centrifugar lo antes posible para remover glóbulos rojos intactos que puedan ocasionar hemólisis y evitar interferencias de la oxihemoglobina.

Se debe tener en cuenta que todos los líquidos amnióticos tienen un grado de turbidez, dependiendo del estado de gestación. La centrifugación o filtración puede ayudar a remover el material particulado presente.

B. Examen microscópico

Células anaranjadas

El líquido amniótico contiene diversos tipos de células fetales, provenientes principalmente del epitelio descamativo. El contenido de células en el líquido amniótico se incrementan con la edad gestacional del feto y ha sido utilizado para predecir la madurez fetal, aprovechando la capacidad de tinción de los lípidos intracelulares con diferentes colorantes, como por ejemplo el sulfato de azul de Nilo. Las células con grasas neutras se tiñen de un color anaranjado en presencia de azul de Nilo, en un porcentaje de alrededor de un

1% cercano a la semana 34, hasta un 10% entre la semana 34 y 38 de gestación, 10% a 50% en la semana 38 a 40 y sobre un 50 % a la semana 40.

En la actualidad estas técnicas de tinción son poco comunes y han sido reemplazadas por otros tipos de exámenes para evaluar la madurez pulmonar fetal.

C. Exámenes químicos

Fosfolípidos

La evaluación de la madurez fetal es importante en determinadas circunstancias obstétricas, cuando es necesario interrumpir el embarazo. Lo que se pretende investigar y conocer es si el feto ha alcanzado la aptitud funcional de sus órganos para la vida extrauterina, sin necesidad de cuidados especiales.

La plena madurez fetal se alcanza durante el tercer trimestre gestacional. Las diversas pruebas disponibles para evaluar la madurez fetal investigan la madurez fetal de órganos tales como pulmón, hígado, riñones y sangre.

Un pulmón maduro presenta un surfactante pulmonar que impide el colapso de los alvéolos durante el ciclo de inhalación y exhalación. Este agente tensioactivo es una mezcla compleja de lípidos y proteínas, siendo los principales la lecitina y esfingomielina.

La cuantificación de lecitina y esfingomielina puede realizarse mediante cromatografía en capa fina. Una razón de L/E inferior a 2 se asocia con inmadurez pulmonar fetal, mientras que una igual o superior a 2 es indicativa de madurez pulmonar fetal. Dado que este procedimiento presenta elevado coeficiente de variación se han desarrollado métodos alternativos más sensibles y específicos en base a inmunoensayos de fosfatidilglicerol.

Glucosa

Es importante la determinación de glucosa en líquido amniótico, con métodos analíticos automatizados, suficientemente sensibles, especialmente en niveles bajos, dado que niveles menores de 16 mg/dL son indicativos de infección.

Bilirrubina

La bilirrubina en el líquido amniótico, es de interés para determinar el grado de hemólisis y la intensidad de la anemia del feto producida por una enfermedad hemolítica cuando existe incompatibilidad materno-fetal.

Normalmente la concentración de bilirrubina en el líquido amniótico es de aproximadamente 10 a 30 µg/dL. La bilirrubina no conjugada producida por la destrucción normal de los glóbulos rojos fetales se remueve rápidamente por la placenta; sin embargo, debido a la inmadurez del hígado fetal, cuando se presenta una enfermedad hemolítica, se incrementa la destrucción de los eritrocitos fetales aumentando los niveles de bilirrubina no conjugada a nivel del líquido amniótico. Su nivel de concentración se correlaciona directamente a la severidad de la hemólisis.

D. Otros exámenes

Para evaluar madurez fetal, alternativamente se han utilizado algunos métodos físicos tales como la prueba de Clements y el recuento de cuerpos lamelares descritos a continuación.

Prueba de Clements

Este método fue descrito por Clements en 1972 como una forma rápida de determinar la madurez pulmonar fetal. Se basa en la propiedad biofísica de que una cantidad suficiente de surfactante pulmonar presente en el líquido amniótico genera una capa de burbujas estables en la interface aire-líquido, cuando se agita en presencia de etanol. Se mezclan partes iguales de líquido amniótico con etanol al 95% y se agita por 15 segundos. Si el anillo de burbujas permanece más de 15 minutos, indica que existe suficiente cantidad de fosfolípidos presentes para reducir la tensión superficial.

Se trata de una técnica semicuantitativa, fácil, rápida y de bajo costo que permite evaluar la capacidad del surfactante de la lecitina en presencia de etanol. Esta prueba muestra buena correlación con la relación lecitina-esfingomielina; sin embargo no es útil con líquido amniótico contaminado porque la sangre y el meconio también tienen el mismo efecto de reducir la tensión superficial.

Cuerpos lamelares

En la actualidad es posible realizar el análisis de los cuerpos lamelares que son partículas de material surfactante citoplasmáticas producidas por los neumocitos tipo 2. Se encuentran en el líquido amniótico a partir de la semana 26 gestacional. Su incremento es proporcional al aumento de los fosfolípidos y de la relación lecitina-esfingomielina.

Dado que presentan un diámetro similar al de las plaquetas, se cuantifican en forma similar al recuento plaquetario, en contadores hematológicos automatizados. Por este motivo la muestra no debe tener contaminación de sangre ni de meconio. La muestra es estable varios días a temperatura ambiente y más de 1 mes refrigerada.

Diferentes autores han establecidos niveles de corte del recuento de cuerpos lamelares, con el uso de contadores hematológicos, para establecer madurez pulmonar fetal, por sobre 30.000 partículas/ μ L; sin embargo, estos recuentos están influenciados por la velocidad de centrifugación previa del líquido, al igual que por el tipo de contador hematológico utilizado, por lo que se recomienda una estandarización previa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Clinical and Laboratory Standards Institute. Analysis of Body Fluids in Clinical Chemistry; Approved Guideline-. CLSI document C49-A. Vol. 27 N° 14, 2007.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Body Fluid Analysis for Cellular Composition; Approved Guideline. CLSI document H-56-A. Vol. 26 N° 26, 2006.
3. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Recomendaciones para el estudio de líquidos biológicos serosos en el laboratorio de urgencias. *Química Clínica* 2004; 23 (3) 141-145.
4. Strasinger, S. – Di Lorenzo, M. Análisis de Orina y de los Líquidos Corporales. 5ª Edición, Editorial: Médica Panamericana, 2010.
5. Brunzel, N. Fundamentals of Urine and Body Fluids Analysis, Saunders, Second edition, Editorial: Saunders, 2004.
6. Angel Mejía, G., Angel Ramelli, M. Interpretación clínica del Laboratorio. 7º edición. Bogotá. Editorial Médica Internacional, 2006.
7. Kestenbaum, et al. Defining Cerebrospinal Fluid White blood Cell Count Reference Values in Neonates and Young Infants. *Pediatrics* Volume 125, number 2, February 2010.
8. Martínez-Castillo, A. Núñez, C. y Cabiedes, J. Análisis de líquido sinovial. *Reumatol Clin.* 2010;6(6):316-321
9. Light RW, MacGregor MI, Luchsinger PC, et al. Pleural effusions: The diagnostic separation of transudates and exudates. *Ann Inter Med* 1972; 77: 507-513.
10. Tietz. Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood and David E. Bruns. Fifth edition. Ed. Elsevier, 2012.
11. Sokolowshi JW Jr., Burgher LW, Jones FL, Patterson JR, Selecky PA. Guidelines for thoracentesis and needle biopsy of the pleura. American Thoracic Society. *Am Rev Respir Dis.* 1989; 140: 257-258.
12. Brosens I., Gordon H. et al. The estimation of maturity by cytological examination of the liquor amnii. *J Obstet Gynaec Brit Cwlth.* 1966; 73: 88-90.