



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

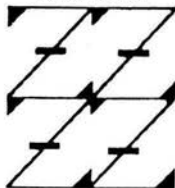
---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

CORRELACION DE 2 METODOS PARA DETERMINAR  
MICROALBUMINURIA EN LA DETECCION DE NEFROPATIA  
DIABETICA TEMPRANA EN ATENCION PRIMARIA DE SALUD

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**  
P R E S E N T A :  
**MARIA SUSANA BARRON RAMIREZ**

UNAM  
FES  
ZARAGOZA



LO HUMANO EJE  
DE NUESTRA REFLEXIÓN

2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ASESORES DE TESIS:

MA. DE LOURDES IRIGOYEN CORIA

MA. DEL PILAR CEDILLO MARTÍNEZ

ANGEL GARCÍA SÁNCHEZ

MA. TERESA GRISELDA FUENTES LARA

HUGO LEYNEZ CELICEO

El trabajo experimental se desarrolló en el Laboratorio de Análisis Clínicos de la Unidad de Medicina Familiar No. 4 del Instituto Mexicano del Seguro Social y en el Laboratorio de la Unidad de Investigación en Nefrología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Orientación: Bioquímica Clínica

## DEDICATORIAS

A DIOS por permitirme cumplir con una etapa más en mi vida,

GRACÍAS por hacerte presente siempre.

A mis PADRES, ha sido duro el esfuerzo de AMBOS, pero siempre con la fuerza de salir adelante y apoyar a sus hijos para lograr sus metas y por estar siempre conmigo.

A mis HERMANOS por el apoyo siempre presente ALMA Y EDGAR por estar juntos en tantas situaciones.

A MIS ASESORES de tesis por el tiempo empleado en la revisión de este trabajo.

A TODAS LAS PERSONAS que me apoyaron durante la realización de este trabajo: QFB Adriana Ruiz de Chavez, QFB Armando, Dra. Rutila Castañeda y a todas aquellas personas que me brindaron su apoyo y amistad

*Muy ESPECIALMENTE A MIS PADRES GREGORIO Y JUANA por estar siempre conmigo*

GRACIAS POR TODO

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ANTECEDENTES	3
CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN	5
CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO	10
CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS	27
CAPÍTULO IV RESULTADOS	40
CAPÍTULO V DISCUSION DE RESULTADOS	54
CAPÍTULO VI CONCLUSIONES	60
ANEXOS Y GLOSARIO	63
ANEXO A	64
ANEXO B	67
GLOSARIO	68
BIBLIOGRAFÍA	70

## RESUMEN

La Estandarización y validación del método turbidimétrico con ácido sulfosalicílico (ASS), así como su correlación con uno de referencia (Nefelometría) para detectar microalbuminuria como signo de daño renal constituye una necesidad para dar un pronto tratamiento, que garantice la calidad de vida de los pacientes que acuden a las instituciones de primer nivel de atención. Los objetivos son estandarizar y validar el método de turbidez con ASS para detectar microalbuminuria y correlacionarlo con el método de referencia (Nefelometría) en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 en una unidad de atención Primaria de Salud.

Para llevar a cabo lo anteriormente mencionado se analizaron muestras de orina de 96 pacientes con diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo 2, para cuantificar microalbuminuria por el método de turbidez con ácido sulfosalicílico y la nefelometría.

Se determinó que la longitud de onda óptima para leer microalbuminuria en el espectrofotómetro fué de 620 nm, con un rango de medición (dentro de la linealidad) en la curva estándar de 4.68 a 150 mg/dL, con un coeficiente de correlación de 0.998, mostrando reproducibilidad en varias determinaciones. La precisión intracorrida fue de 5.55 y 2.22 % (para 11 y 22 mg/dL respectivamente), e intercorrida de 7.17 y 4.81% (para 11 y 22 mg/dL respectivamente). La recuperación del método fue buena. El coeficiente de

correlación con el método de referencia fue de 0,964; sensibilidad nosológica de 75.0%, especificidad nosológica de 85.71%, valor predictivo positivo de 72.41% valor predictivo negativo de 87.27% y eficiencia de 82.14%.

El método turbidimétrico con ASS mostró ser un método adecuado para valorar a pacientes con microalbuminuria ya que hubo buena correlación con la Nefelometría. Es un método económico y sencillo que facilita su uso en Clínicas de Primer Nivel de Atención o en aquellas que no cuenten con los medios económicos para emplear métodos altamente sensibles y específicos de tal forma que permita una rápida y oportuna atención, así como el tratamiento.



ANTECEDENTES

La nefropatía diabética es una enfermedad conocida desde 1936 cuando Kimmestiel y Wilson, dos anatomopatólogos alemanes, descubrieron la forma nodular de esta glomerulopatía. En 1942 Fahr y Bell describieron la forma difusa en el microscopio óptico y con la llegada de la microscopía electrónica se observó que las primeras alteraciones histopatológicas son la expansión del mesangio y el engrosamiento de la membrana basal del capilar glomerular. Los métodos analíticos empleados para el análisis de microalbuminuria como signo de daño renal han sido desde las tiras reactivas para leer proteinuria por cambio de color hasta los métodos automatizados inmunoquímicos, pasando por aquellos cualitativos que utilizan ASS, ácido tricloroacético, y los que emplean colorantes, para leerse por colorimetría. En 1946 Bernard y Scher desarrollaron pruebas de precipitación cualitativas para demostrar proteinuria con ácido sulfosalicílico; sin embargo, a la fecha es necesario contar con una técnica cuantitativa, sencilla y económica que detecte albúmina en orina en concentraciones pequeñas, practicable en atención primaria de salud, para el diagnóstico temprano del paciente con alteración en la función renal como la Nefropatía incipiente.

CAPÍTULO I  
INTRODUCCIÓN

## 1. INTRODUCCIÓN

El deterioro de la función renal es un proceso continuo que avanza de manera silenciosa desde sus etapas tempranas (Nefropatía Incipiente), cuando no se detecta a tiempo progresa irreversiblemente a Insuficiencia Renal Crónica (IRC), creando un problema social, sanitario y económico de importancia que afecta la calidad de vida de los pacientes y de sus familias así como la generación de gastos en el Sector Salud, debido a la necesidad de practicar un tratamiento como diálisis, hemodiálisis o trasplante renal. El daño renal se presenta con más frecuencia en pacientes con diabetes mellitus, sin embargo, otra afección que ocasiona la falla renal es la hipertensión.

La nefropatía diabética incipiente es reversible, y es importante detectar el daño renal de manera temprana pues cuando se diagnóstica en esta etapa se puede frenar y el paciente tiene oportunidad de conservar la función renal. En el laboratorio existe un parámetro que permite llevar cabo esta detección oportuna: la excreción urinaria de albúmina en concentraciones pequeñas [30-300 mg/24h o 20-200 mg/L (2-20 mg/dL)], como signo de daño renal progresivo e incipiente definido como Microalbuminuria. El riñón normalmente excreta sustancias de bajo peso molecular y retiene macromoléculas como la albúmina; cuya excreción urinaria normal es menor a 20 mg/L (2.0 mg/dL).

Hay métodos cualitativos, semicuantitativos y cuantitativos para determinar microalbuminuria, como la tira reactiva; los bioquímicos basados en la unión a colorantes; los inmunológicos y los inmunoquímicos como la nefelometría. El

empleo de las tiras reactivas es común en el laboratorio de análisis clínicos para realizar el examen general de orina, y la proteinuria es uno de los parámetros que incluye este estudio. Este es un método semicuantitativo que detecta concentraciones a partir de 30 mg/dL es decir macroproteinuria. Sin embargo, su utilización no es tan confiable puesto que depende de la experiencia y sagacidad de quien la lee y es un indicador de macroproteinuria es decir, de daño renal relativamente severo e irreversible. Por ende es importante contar con métodos cuantitativos estandarizados y económicos que permitan un diagnóstico temprano.

Para implementar y estandarizar un método bioquímico es necesario conocer el fundamento de la reacción, el producto final y evaluar los criterios de confiabilidad del método y correlacionarlo con un método de referencia.

Para leer la albúmina urinaria por espectrofotometría se requiere seleccionar la longitud de onda óptima; aquella en la cual no haya absorción de luz por efecto de otros compuestos presentes en la muestra de orina, por medio de un barrido con un patrón primario (para nuestros fines es albúmina bovina) en el espectro de la región UV y Visible (350-700 nm). Los parámetros de confiabilidad [linealidad de la curva estándar, sensibilidad analítica, imprecisión, inexactitud, índice de recuperación y la correlación del método con uno de referencia (en nuestro caso utilizamos la Nefelometría)] dan la validez del método para decidir si es posible utilizarlo en niveles de atención primaria de salud.

El método turbidimétrico con ASS se basa en la propiedad de precipitación de la

albúmina cuando alcanza su punto isoeléctrico produciendo turbidez cuantificada por espectrofotometría.

La nefelometría es un método inmunoquímico (mide la dispersión de la luz en un ángulo de 70° cuando se forma el complejo antígeno-anticuerpo) de alta precisión y exactitud, por lo cual constituye un método de referencia capaz de distinguir con certeza a aquellos pacientes que presenten microalbuminuria de aquellos que no la presentan. Sin embargo, es un método costoso y sólo se utiliza en hospitales de tercer nivel de salud o particulares, excluyendo a la población carente de recursos, lo cual la deja sin posibilidades de recibir un diagnóstico temprano y la atención oportuna.

Además, debe tenerse siempre en consideración que la mayoría de los pacientes acuden fácilmente a los niveles de atención primaria del Sector Salud, por lo que es de vital importancia contar con una alternativa analítica, que permita al médico familiar o general diagnosticar el daño renal incipiente e implementar medidas terapéuticas sencillas de adoptar.

La cuantificación de microalbuminuria se realiza en orina de 24 horas; sin embargo, tiene la desventaja de producir errores durante su recolección así como permitir factores que interfirieran con la medición, tales como el ejercicio, el estrés y la dieta proteica, por tal motivo se prefiere la muestra de orina de micción matutina.

Debido a que no se dispone de métodos sencillos, accesibles y económicos para cuantificar microalbuminuria en atención primaria de salud, resulta de suma

importancia y utilidad el procedimiento analítico llevado a cabo en este estudio, la estandarización y validación del método turbidimétrico con ASS como herramienta útil para el laboratorio.

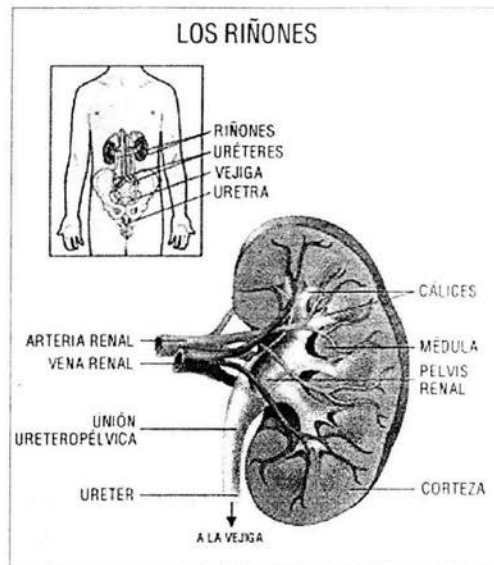
CAPÍTULO II  
MARCO TEÓRICO



## 2.0 MARCO TEÓRICO

El riñón desempeña un papel importante en la eliminación de sustancias de desecho del organismo, su integridad depende de muchos factores, uno de los cuales es el tratamiento adecuado cuando se presenta una alteración como la Insuficiencia Renal Crónica, este trastorno lleva al fracaso de la función del riñón. Los riñones son un par de estructuras en forma de haba localizadas en la parte posterior de la cavidad abdominal. La figura 1 muestra el esquema del riñón y su estructura de la sección vertical <sup>(19)</sup>

Figura 1 Esquema de los riñones



19. Figura tomada de National Kidney and Urologic Diseases. [www.Kidney.niddk.nih.gov/spanishpub](http://www.Kidney.niddk.nih.gov/spanishpub)

La Insuficiencia Renal Crónica (IRC) se produce en el momento en que la función de los riñones disminuye, esto sucede cuando el número de nefronas (unidad fundamental del riñón) funcionales se reduce hasta un 30 % al momento en que aparecen los síntomas clínicos graves y se pierde la homeóstasis de líquidos y electrolitos. Es un proceso que involucra la retención de productos nitrogenados así como la eliminación de macromoléculas (1 - 4). El progreso y severidad del daño renal es monitoreado por la determinación de creatinina y urea, pero estas determinaciones solo proporcionan el avance inminente de lesión renal (5).

La IRC es un problema sanitario, económico y de salud muy importante que afecta la calidad de vida de los pacientes, así como el costo generado a las instituciones de salud. El manejo de los pacientes con diálisis peritoneal y hemodiálisis, tratamiento y dieta repercute en los costos que el Sistema Nacional de Salud debe invertir en ellos. El costo de un programa de diálisis peritoneal tres veces por semana es aproximadamente de \$5,500.00 mensuales y de hemodiálisis dos veces por semana de \$6,500.00 mensuales refiriéndose exclusivamente al material propio del procedimiento, esto no incluye terapia adicional, hospitalización, sueldo de médicos y auxiliares, análisis de laboratorios y rayos X<sup>(a)</sup>.

Una de las etapas tempranas que progresa a IRC es la Nefropatía Incipiente, donde el daño en el riñón no es tan grande y puede ser reversible.

<sup>(a)</sup> Datos obtenidos del Sistema de Información Médica del hospital Gabriel Mancera IMSS

La Nefropatía es causada por diversas patologías, la más frecuente es la diabetes mellitus (10 – 40 %), la hipertensión (25 %), glomerulonefritis (20 %), entre otras de origen no determinado (1, 5).

La diabetes mellitus (DM) es uno de los padecimientos sistémicos que tiene mayor morbilidad a escala mundial y en México (5), lo cual hace que sea una de las enfermedades de más cuidado en el ámbito hospitalario y es la segunda causa de muerte en la población Mexicana donde el 55.2 % de la población tiene microalbuminuria (6). La hiperglucemia es indudablemente una condición para el desarrollo de nefropatía diabética pero solo aproximadamente 30 - 40 % la desarrolla (7).

La nefropatía puede estar presente en el 10 - 20 % de los pacientes con diagnóstico reciente de diabetes mellitus tipo 2 (DM2), muchos de los cuales también tienen hipertensión (7). En la DM2, el 20 – 40 % de los pacientes con microalbuminuria progresa a desarrollar nefropatía clínica pero alrededor de los 20 años con esta complicación el 20% desarrolla IRC terminal (7). De igual manera se ha informado que 2 de cada 10,000 personas desarrollan hipertensión a escala mundial lo que hace que en la actualidad existan 20,800 pacientes en nuestro país con esta enfermedad <sup>(b)</sup> La IRC se refiere como una epidemia silenciosa que no se encuentra lo suficientemente informada entre los pacientes como una complicación grave (8).

<sup>(b)</sup> Datos obtenidos de INEGI

Estudios de biopsia demuestran que el daño renal en pacientes diabéticos se presenta mucho tiempo antes de diagnosticarse y también antes de presentar albuminuria a niveles bajos que producen la nefropatía diabética (6).

En 1936 se inició el conocimiento de las lesiones nodulares intercapilares en los glomérulos para entender mejor el cuadro clínico en los pacientes con IRC (9). Dolger observó la presencia de albuminuria e hipertensión en 50 % de los diabéticos juveniles con retinopatía cuando tenían 13 años de evolución de la diabetes mellitus (9).

La evidencia clínica temprana de nefropatía es la aparición de niveles bajos pero anormales (mayores de 30 mg/día o mayor de 2 mg/dL.) de albúmina en orina, referida como microalbuminuria, y pacientes con microalbuminuria referidos como portadores de nefropatía diabética incipiente (10). El Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) invierte más de 168 millones de pesos para atender a 30 mil ingresos hospitalarios por diabetes mellitus al año, que en promedio permanecen en el hospital durante siete días (9).

La nefropatía incipiente es detectada por microalbuminuria definida como la excreción de albúmina entre 30 - 300 mg/24h [2.0-20.0 mg/dL] (6, 7, 11 - 13). Esto sucede cuando la pared glomerular pierde o reduce la carga negativa y permite a la albúmina pasar al interior. (3, 12). En las primeras etapas del daño renal se describe una lesión patológica de estadio temprano, (la expansión y espesamiento del mesangio de la membrana glomerular), la pared del glomérulo capilar es altamente permeable a solutos pequeños y agua, y de permeabilidad

variable a moléculas grandes como la albúmina. A continuación procede una hiperfiltración glomerular y una elevación en la presión intraglomerular, que lleva a la pérdida del riñón (6, 8, 14).

La clasificación que describe el progreso del desarrollo de daño renal más utilizada es la de Mogensen (6, 15 - 17) quien la divide en cinco etapas:

Etapa I.- Hay expansión del glomérulo y puede haber aumento de la excreción de albúmina basal y post-ejercicio.

Etapa II (etapa silenciosa).- Aparecen lesiones histopatológicas mínimas, persiste el aumento del filtrado glomerular, hay microalbuminuria intermitente.

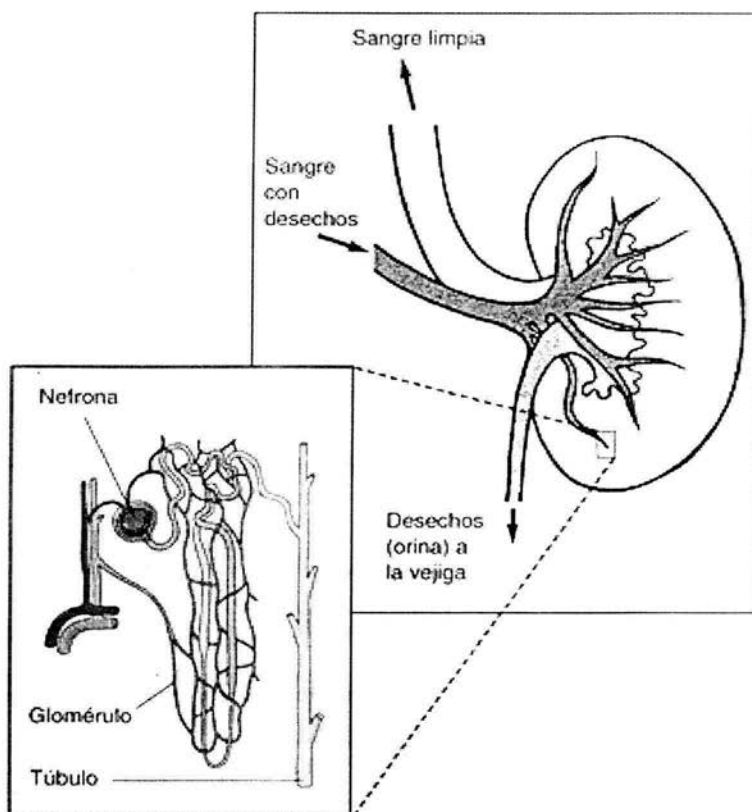
Etapa III (Nefropatía incipiente).- Se acentúan las lesiones estructurales y alteraciones funcionales, puede haber aumento incipiente de la presión arterial, hay microalbuminuria.

Etapa IV (Nefropatía Clínica).- Corresponde a la nefropatía clínica con el síndrome clínico completo: macroproteinuria, a veces síndrome nefrótico, hipertensión arterial, retinopatía diabética; hay gran engrosamiento de la membrana basal y zonas de esclerosis glomerular.

Etapa V (Estado urémico) corresponde a la etapa de insuficiencia renal avanzada con el cuadro clínico del síndrome urémico, el daño está avanzado, se pierde la función de filtración glomerular. La fig. 2 muestra

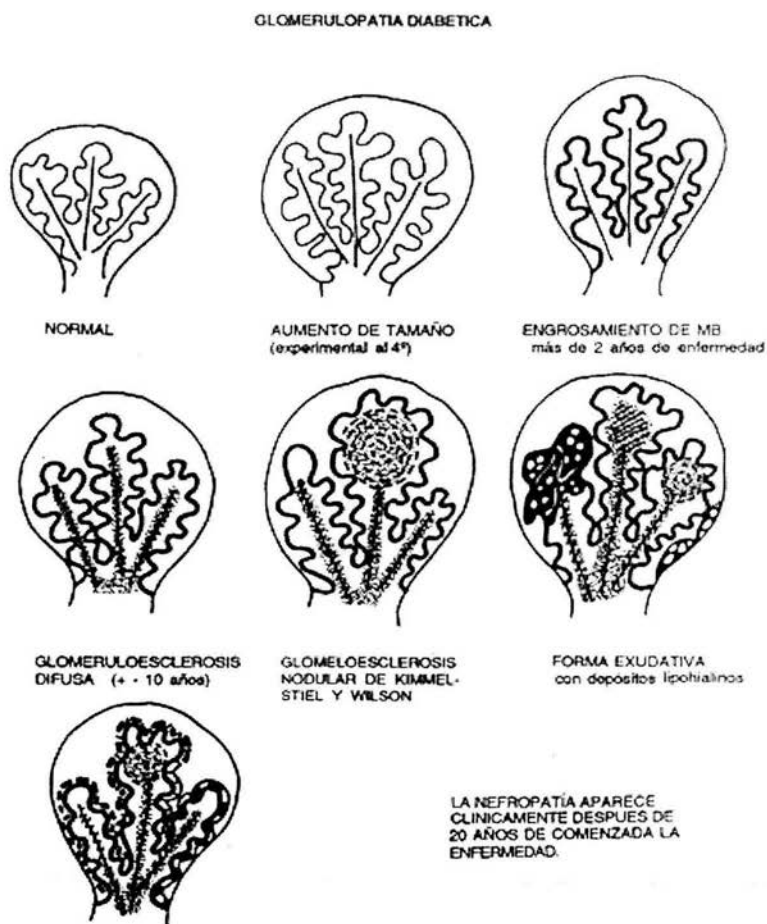
el esquema de una nefrona normal <sup>(2)</sup> y la fig. 3. muestra el daño progresivo del glomérulo <sup>(3)</sup>.

Figura 2. Esquema del riñón y de la nefrona



2º. Figura tomada de National Kidney and Urologic Diseases. [www.Kidney.niddk.nih.gov/spanishpub](http://www.Kidney.niddk.nih.gov/spanishpub)

Figura 3. Progresión del daño renal a Nefropatía



3ª. Figura tomada de National Kidney and Urologic Diseases. [www.Kidney.niddk.nih.gov/spanish/pub](http://www.Kidney.niddk.nih.gov/spanish/pub)

Debido a que la pared glomerular contiene moléculas cargadas negativamente se limita la filtración glomerular a proteínas como la albúmina, por repulsión electrostática (3).

La albúmina se sintetiza en el hígado, tiene un peso molecular de 66.000 Kdaltons, carga negativa y constituye el 60 % de las proteínas plasmáticas totales. Sus funciones son mantener la presión oncótica y el transporte del  $\text{Ca}^{2+}$  (18, 19). Se ha informado que la molécula de albúmina es muy estable aún a temperatura ambiente hasta por una semana o en refrigeración por varios meses (13, 20).

La determinación de la concentración de la Excreción de Albúmina Urinaria (EAU), no solo se relaciona al diagnóstico de la nefropatía, sino también con la rápida intervención. El grado de microalbuminuria es usualmente utilizado como indicador de nefropatía temprana y de progresión (6).

El Rango de Excreción de Albúmina Urinaria (UAER, por sus siglas en inglés) es 50 – 100 % más alto durante el día que por la noche, esta variación puede estar relacionada con una marcada variación diurna en la presión sanguínea (6, 20). La variabilidad individual tiene un coeficiente de variación de aproximadamente 30 - 50 % (6, 20), debido a esto la Asociación Americana de Diabetes (ADA por sus siglas en inglés) recomienda para diagnóstico de microalbuminuria la demostración del incremento de la albúmina en 2 de 3 pruebas repetidas en un periodo de 3 a 6 meses (9).

Las variaciones en la concentración de albúmina, se deben a varios factores



como: el ejercicio físico, infecciones del tracto urinario, hematuria, menstruación, dieta rica en proteínas (20), que pueden incrementar su valor en la albúmina urinaria y confundir los resultados ocasionando falsos positivos; así mismo una reducción en la ingesta proteica puede disminuir la microalbuminuria y ocasionar falsos negativos.

Para el diagnóstico de los pacientes con microalbuminuria a quienes no se les ha realizado ninguna prueba renal, se les recomienda en primer lugar evaluar la detección de proteína en una muestra de orina por el método semicuantitativo [tira reactiva] (21). Si es negativa la prueba con tira reactiva, se recomienda realizar la determinación de microalbuminuria por métodos cuantitativos y estandarizados. La tira reactiva empleada en el examen general de orina valora la presencia de proteínas, densidad, pH, leucocitos, presencia de sangre, urobilinogeno, glucosa, bilirrubina, cetonas y nitritos en la orina de la mañana que dan de manera general las condiciones del paciente de forma rápida y sencilla.

La determinación de proteínas en tira reactiva a pH constante, utiliza el indicador de azul de tetrabromofenol, el desarrollo de cualquier color verde es debido a la presencia de proteína. El rango de colores va de amarillo para negativo pasando por el verde-amarillo y verde a verde azul para resultados positivos (22, 23). Normalmente se excreta una cantidad mínima de proteínas por el riñón la cual no es detectable, pero cuando se indica trazas ésta es proteinuria significativa. Se han realizado diversos estudios en el análisis de la tira reactiva considerando el

impacto en una muestra positiva para el seguro tratamiento y disponibilidad en su costo; esta tira proporciona resultados semicuantitativos que pueden ayudar a los médicos a detectar a aquellos pacientes que corren el riesgo de desarrollar daño renal.

La mayoría de las pruebas bioquímicas se realizan basándose en la precipitación de las proteínas en soluciones ácidas, alcalinas y calor (23) cuando alcanzan su punto isoeléctrico. Existen reportes de mediciones de turbidez para la determinación de proteínas en líquido cefalorraquídeo leídas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 y 620 nm (24, 25). La espectrofotometría se basa en el principio de interacción de radiaciones electromagnéticas con la materia. La técnica turbidimétrica determina la cantidad de luz bloqueada por la materia en forma de partículas cuando la luz atraviesa la cubeta, establecido conforme a la ley de Lambert-Beer donde la absorbancia (luz bloqueada) es directamente proporcional a la concentración de la muestra (26 - 35). El barrido se realiza para seleccionar la longitud de onda óptima en el espectro de absorción a diferentes longitudes de luz en la región UV y Visible (350-700 nm), y la optimización del método mediante una curva estándar a partir de un estándar primario de albúmina bovina cristalizada, realizada en varias ocasiones para ver su reproducibilidad. La longitud de onda mas corta tiene mayor dispersión, sin embargo, puede haber interferencias con sustancias presentes en la misma muestra que absorban luz (36).

Por su parte la determinación nefelométrica se basa en una reacción antígeno-

anticuerpo. Para la determinación del antígeno se realiza la adición constante de antisuero específico altamente purificado y ópticamente puro (37, 38), en teoría es un método simple y rápido para medir muchos antígenos en líquidos biológicos que se basa en la medición de la dispersión de la luz en un ángulo de  $70^\circ$  (36). Este método fue introducido por Libby en 1938 para determinar la reacción de toxina difterica y antitoxina (37), esta técnica ha incrementado su aplicación en el análisis clínico pero debido a su costo alto sólo se aplica en hospitales de tercer nivel o particulares. Debido a su alta precisión y exactitud constituye un método de referencia, el cual siempre da resultados positivos en pacientes con la enfermedad y resultados negativos en aquellos sin la enfermedad (31). Sin embargo, a pesar de haber probado su utilidad los métodos nefelométricos por su costo no son muy utilizados en los laboratorios de análisis clínicos de rutina, además los cuidados que requieren los equipos automatizados que se emplean para estas determinaciones hacen que su utilización se vea reducida a laboratorios especializados (generalmente del tercer nivel de atención en el Sector Salud) o bien para laboratorios particulares con grandes recursos económicos. Estas limitaciones hacen necesario implementar un procedimiento analítico que facilite la determinación de microalbuminuria en laboratorios del primer nivel de atención.

La selección de procedimientos se basa en criterios de practicabilidad y confiabilidad (39). Estos últimos describen la ejecución analítica del método cuando se utiliza en condiciones de rutina como: precisión, exactitud,

sensibilidad, linealidad, límite de detección intervalo de medición, especificidad e interferencia analítica.

La PRECISIÓN determina el grado de discordancia o imprecisión de los valores. Se define como la desviación estándar o el coeficiente de variación (CV) del resultado de un conjunto de mediciones repetidas e informa del error aleatorio (39, 40). La desviación estándar de una intracorrida es menor a la que se obtiene en diferentes días. Las principales causas de imprecisión se deben al empleo de diferentes reactivos, estándares de calibración y temperatura (39, 40). Se recomienda para la determinación de microalbuminuria un coeficiente de variación inferior al 10% aunque algunos autores sugieren un  $CV < 15\%$  (41, 42).

La EXACTITUD determinada como inexactitud, es una medida de discordancia del valor obtenido en un espécimen y su valor real o asignado. Tal discordancia es debida al error sistemático y/o al error aleatorio. Se evalúa por medio de materiales de control de valor asignando o por controles comerciales. (39, 40, 43).

La SENSIBILIDAD ANALÍTICA es la medida de la capacidad de un método para detectar pequeñas cantidades de la sustancia que se analiza (40, 43).

El LÍMITE DE DETECCIÓN es aquel que resulta igual a tres veces la desviación estándar del blanco del espécimen que no contiene la sustancia que se mide (40).

La LINEALIDAD determina el intervalo analítico, que se define como el intervalo de concentración o de la magnitud que se mide, en el que existe una

relación lineal entre el valor real y el obtenido por el método (39, 40). También se le conoce por el rango en el cual se cumple la ley de Lambert y Beer y es posible tener una lectura en el espectrofotómetro relacionada a una única concentración de la sustancia que se está determinando.

La RECUPERACIÓN demuestra la capacidad para medir la sustancia pura cuando se añade a los especímenes que se analizan en forma rutinaria. Informa sobre la inexactitud y tiene particular interés cuando en la realización del método haya pasos en los que pueden producirse pérdidas (39, 40, 43).

La ESPECIFICIDAD ANALÍTICA representa la capacidad para medir únicamente el componente que se quiera medir y la interferencia se refiere a las influencias que ejercen determinadas sustancias, que por sí mismas no producen lectura alguna (40, 43).

La SENSIBILIDAD NOSOLÓGICA es la probabilidad de que el sujeto tenga la enfermedad y la prueba de positiva (40, 43 - 45).

La ESPECIFICIDAD NOSOLÓGICA es la probabilidad de que el sujeto no tenga la enfermedad y la prueba de negativa (40, 43 - 45)

El VALOR PREDICTIVO POSITIVO (VPP), es la probabilidad de que alguna persona con resultado positivo actualmente tenga la enfermedad (40, 43 - 45).

El VALOR PREDICTIVO NEGATIVO (VPN), es la probabilidad de alguna persona con resultado negativo no tenga la enfermedad actualmente [el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo son dependientes de la sensibilidad y especificidad (40, 43 - 46).

## 2.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que la función renal se afecta por diversas enfermedades principalmente diabetes mellitus e hipertensión arterial, se debe evitar que evolucione y se desarrolle IRC, generando una disminución en la calidad de vida del paciente. Los gastos a instituciones de salud se incrementan debido a tratamientos de diálisis peritoneal y hemodiálisis. La IRC es una enfermedad silenciosa e irreversible que evoluciona lentamente. En el laboratorio se evalúa la función renal por la cuantificación de creatinina y urea sin embargo, es posible detectarla en sus etapas tempranas por medio del monitoreo de la microalbuminuria, (excreción de albúmina urinaria de 2.0 – 20.0 mg/dL) y tratarla evitando su progresión. La nefropatía Incipiente (etapa de microalbuminuria) es aún un proceso reversible y controlable, la rápida detección permite una intervención inmediata y control. Es importante el desarrollo de técnicas sensibles, específicas y de bajo costo para la detección de microalbuminuria y así facilitar la intervención oportuna del médico. El método con ácido sulfosalicílico para cuantificar microalbuminuria en el laboratorio tienen un costo aproximado de \$0.50 (cincuenta centavos) por muestra, que comparado con el método nefelométrico es de \$40.00 (cuarenta pesos) por muestra, costo inaccesible para su uso en atención de primer nivel de salud así como en lugares que no tienen acceso a esta técnica. La nefelometría es un método inmunoquímico, sensible, específico, rápido y de fácil realización, el cual tiene un coeficiente de correlación de 0.99 comparado con RIA. Sin embargo

requiere de equipo automatizado que no está al alcance de todos los laboratorios. El método de detección de proteínas por precipitación con ácido sulfosalicílico se utiliza en la cuantificación de éstas en líquido cefalorraquídeo, éste método se ha habilitado en los servicios de urgencias en todos los niveles de atención en salud. Es de fácil realización, económico y rápido, además por la importancia médica del estudio existen los reactivos en todos los niveles de atención que cuenten con un servicio de urgencias. El reactivo de ácido sulfosalicílico ya preparado por ende se encuentra disponible, facilitando así la habilitación del método para la microalbuminuria urinaria.

Por lo anterior se pretende ver su practicabilidad y eficiencia al emplearlo en muestras de orina, planteando para ello las siguientes preguntas.

¿El método turbidimétrico con ácido sulfosalicílico tiene buena correlación con el método de referencia (la nefelometría), para la determinación de microalbuminuria?

¿El método turbidimétrico con ácido sulfosalicílico es sensible y específico comparado con la nefelometría?

¿El método que se está evaluando (con ácido sulfosalicílico) es útil para determinar microalbuminuria en los Laboratorios de Análisis Clínicos del Primer Nivel de Atención de Salud en México?

¿El método turbidimétrico con ácido sulfosalicílico es una herramienta auxiliar eficiente para el laboratorio?

## 2.3 OBJETIVOS

### OBJETIVOS GENERALES

- Estandarizar y validar el método de turbidez con ácido sulfosalicílico para determinar microalbuminuria en pacientes diabéticos en un primer nivel de atención de salud.
- Correlacionar dos métodos para determinar microalbuminuria (turbidez y nefelometría) en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 en una unidad de atención Primaria de Salud.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Encontrar la longitud de onda óptima para leer albúmina.
- Determinar para el método de turbidez con ácido sulfosalicílico los parámetros de confiabilidad: linealidad, interferencia del color, límite de detección, rango de medición, imprecisión, inexactitud, índice de recuperación sensibilidad, especificidad nosológica, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo

### HIPÓTESIS

Si los parámetros de confiabilidad del método turbidimétrico por espectrofotometría con ácido sulfosalicílico son aceptables y demuestra una buena correlación con el método Nefelométrico, entonces será posible implementarlo en laboratorios de primer nivel de atención del Sector Salud.



### CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 TIPO DE ESTUDIO

Observacional Prospectivo Transversal.

### 3.2 TAMAÑO Y DISEÑO DE LA MUESTRA

Con el fin de que la muestra fuera representativa de la población atendida, se calculó el tamaño de la muestra (22. 23) con base en las siguientes consideraciones:

3.2.1 El límite de confiabilidad deseado es de 95%.

3.2.2 Un total (N) de 1,500 pacientes que acuden mensualmente a consulta en los servicios médicos que se prestan en la Unidad de Medicina Familiar No 4 del IMSS, y se les solicita el examen general de orina. Se le define también como el tamaño de la población.

3.2.3 Un promedio de 600 muestras se reciben mensualmente en el Laboratorio de Análisis Clínicos de pacientes que padecen Diabetes Mellitus 2, para que les sea practicado el examen general de orina, que incluye la determinación de proteinuria, por lo que  $p = 40 \%$ . Se le asigna estadísticamente como la proporción aproximada del fenómeno en estudio en la población de referencia.

3.2.4 Se considera por tanto, que son 900 los pacientes a los que se atienden en el Laboratorio de Análisis Clínicos y que tienen un diagnóstico diferente al de diabetes mellitus 2, así que  $q$  es igual a 60 %, es decir, es la proporción que no presenta el fenómeno en estudio (100-p).

3.2.5  $n$  se encuentra definida como el tamaño de muestra requerida para que el estudio sea representativo de la población que se está evaluando.

3.2.2.6  $Z_c$  es el valor de Zeta crítica correspondiente al nivel de error aceptado, también conocido como nivel de confianza de parámetros poblacionales, en el área de la salud para una probabilidad de error de 5% es de 1.96.

3.2.7  $d$  es el intervalo de confianza deseado en la determinación de la proporción de población que presenta el fenómeno en estudio. La seleccionada para el presente trabajo se seleccionó de 10.0 de intervalo de confianza.

$$n = N \frac{Z_c^2 p q d^2}{(N-1) + Z_c^2 p q}$$

$$n = (1500) \frac{(1.96)^2 (40)(60)(10)^2}{(1500 - 1) + (1.96)^2 (40)(60)}$$

$$n = 87 \text{ muestras.}$$

### 3.3 POBLACIÓN

De los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 ambos sexos que acuden a la toma de muestra del Laboratorio de Análisis Clínicos de Primer Nivel de Atención de Salud de la Unidad de Medicina Familiar No. 4, IMSS, referidos por el médico familiar que los atiende y que llevan la primera orina de la mañana, diariamente llegan un promedio de 18 y 20 pacientes / día. A todas las muestras se les practicó el examen general de orina y se seleccionaron para el estudio aquellas muestras que con la tira reactiva para proteínas dieron resultado negativo, huellas y una cruz (cumplieron con los criterios de inclusión).

### 3.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Derechohabientes de la UMF No 4 (IMSS), que asisten al Laboratorio Clínico para toma de muestra con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 a los que su médico familiar les solicitó examen general de orina, en el periodo de diciembre de 2002 a abril de 2003.

A todas las muestras recolectadas se les practicó el examen general de orina, se incluyeron en el estudio todas aquellas muestras que fueron negativas para proteinuria, o bien se les detectaron huellas y una cruz de proteínas con la tira reactiva que se emplea rutinariamente para dicho examen.

### 3.5 CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN

Derechohabientes de la UMF No 4 (IMSS), que asisten al Laboratorio Clínico para toma de muestra, con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 a los que su médico familiar no les solicitó el examen general de orina, en el periodo de diciembre de 2002 a abril de 2003.

Aquellas muestras que presentaron 2 ó 3 cruces de proteínas en la tira reactiva.

### 3.6 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Derechohabientes de la UMF No 4 (IMSS), que asisten al Laboratorio Clínico para toma de muestra, sin diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2.

### 3.7 VARIABLES

#### 3.7.1 VARIABLE DEPENDIENTE

Presencia de microalbuminuria en las muestras.

#### 3.7.2 VARIABLES INDEPENDIENTES

- Pacientes con diabetes mellitus tipo 2
- Edad
- Sexo

3.8 DISEÑO ESTADÍSTICO.- Para la estandarización, validación y correlación el método se utilizaron las siguientes fórmulas estadísticas.

3.8.1 MEDIA (X): Es una medida de tendencia central (40). La suma de todos los valores obtenidos entre el número de ellos.

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$$

3.8.2 DESVIACIÓN ESTANDAR (S).- Es una medida de dispersión, describe el grado de variación entre las observaciones individuales (40)

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

3.8.3 COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV): Refleja la dispersión de los datos, se calcula dividiendo la desviación estándar entre el promedio, multiplicado por 100.

$$CV = \left( \frac{S}{\bar{X}} \right) 100$$

3.8.4 COEFICIENTE DE CORRELACIÓN. Es un estudio estadístico que mide la asociación entre dos variables. Los resultados son idénticos cuando el coeficiente es 1.0 y son diferentes cuando los valores se alejan de 1.0.

3.8.5 TEOREMA DE BAYES. Tabla de contingencia 2 X 2.- Es un método estadístico para determinar sensibilidad y especificidad nosológica, valores predictivos positivo y negativo (Cuadro 1).

CUADRO 1. TABLA DE CONTINGENCIA 2X2

Método de prueba	Método de referencia			
		Enfermedad		
	Resultado	Presente	Ausente	Total
	Positivo	a	b	a+b
	Negativo	c	d	c+d
	Total	a+c	b+d	a+b+c+d

3.8.5.1 SENSIBILIDAD NOSOLÓGICA = Es la probabilidad de que el sujeto tenga la enfermedad y la prueba dé positiva.

$$\text{Sensibilidad nosológica} = \left( \frac{a}{a+c} \right) 100$$

3.8.5.2 ESPECIFICIDAD NOSOLÓGICA = Es la probabilidad de que el sujeto no tenga la enfermedad y la prueba dé negativo.

$$\text{Especificidad nosológica} = \left( \frac{d}{b+d} \right) 100$$

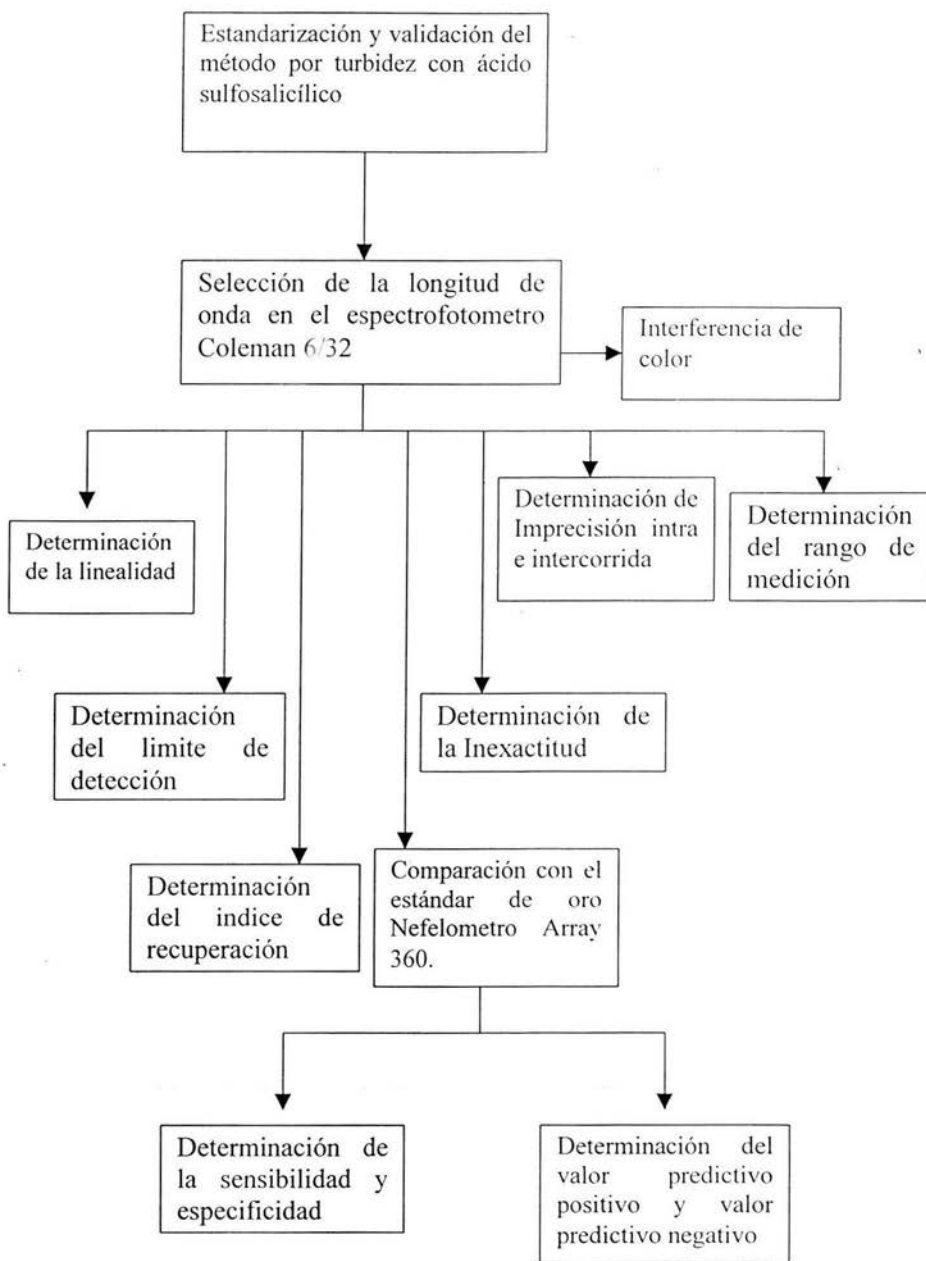
3.8.5.3 VALOR PREDICTIVO POSITIVO (VPP).- Es la probabilidad de que la persona con prueba positiva actualmente tenga la enfermedad.

$$\text{VPP} = \left( \frac{a}{a+b} \right) 100$$

3.8.5.4 VALOR PREDICTIVO NEGATIVO (VPN).- Es la probabilidad de que la persona con prueba negativa actualmente no tenga la enfermedad.

$$\text{VPN} = \left( \frac{c}{c+d} \right) 100$$

### 3.9 DIAGRAMA DE FLUJO DE LOS PASOS A SEGUIR





### 3.10 DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO ANALÍTICO. MÉTODO TURBIDIMÉTRICO POR PRECIPITACIÓN CON ÁCIDO SULFOSALICÍLICO.

Estandarización y validación del método para determinar microalbuminuria por turbidez con ácido sulfosalicílico.

#### 3.10.1 FUNDAMENTO

La albúmina es una proteína que al reaccionar con el ácido sulfosalicílico alcanza su punto isoeléctrico produciendo un precipitado, que impide el paso de luz en un espectrofotómetro, siendo cuantificable por lo establecido conforme a la ley de Lambert-Beer donde la absorbancia es directamente proporcional a la concentración

#### 3.10.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Primera orina de la mañana centrifugada

Control comercial de albúmina bovina

Albúmina bovina cristalizada

#### 3.10.3 MATERIAL DE LABORATORIO Y EQUIPO

Tubos de 13 por 100 mm

Gradillas para tubos

Pipetas graduadas de 1.0 y 10.0 mL

Pipetas volumétricas de 1.0 mL

Celdas espectrofotométricas calibradas

Matraz aforado de 100 mL

Centrifuga Clínica Hermile Illinois USA

Espectrofotómetro Coleman Instrument Model 6/32 Jr II

Nefelómetro Beckman Array 360 protein system manufacturado en US

Balanza analítica Sartorius

#### 3.10.4 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PATRÓN.

PREPARACIÓN DE UN PATRÓN PRIMARIO DE ALBÚMINA. Se pesaron 300 mg de albúmina sérica bovina cristalizada, se depositaron en el matraz aforado y se le añadió solución salina isotónica hasta la marca para obtener un volumen final de 100 mL con lo que se obtiene una concentración final de 300 mg/100 mL, 300 mg/dL.

DILUCIONES DEL PATRÓN PRIMARIO (PREPARACIÓN DE PATRONES SECUNDARIOS): Se realizaron diluciones seriadas a partir del patrón primario de 300 mg/dL para obtener concentraciones finales de 150 mg/dL, 75 mg/dL, 37.5 mg/dL, 18.75 mg/dL, 9.375 mg/dL, 4.68 mg/dL, 2.34 mg/dL, 1.17 mg/dL con solución salina isotónica.

#### 3.10.5 REACTIVOS

ACIDO SULFOSALICÍLICO AL 3 %. Se utilizó una solución comercial de ácido sulfosalicílico al 3.0 % E.L.S.A para el estudio. Se emplearon reactivos de un solo lote.

## PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

Se toma una alícuota de la primera orina de la mañana, se centrifuga a 3.000 rpm por 5 minutos. Del sobrenadante se toma 1.0 mL de la muestra, se le añaden 3.0 mL de la solución de ácido sulfosalicílico al 3.0 %. Se mezcla por inversión dejando reposar la mezcla por 5 minutos y se lee a 620 nm en el espectrofotómetro Coleman JR 6/32.

## CONTROL DE CALIDAD DEL PROCESAMIENTO

Se determinó en cada corrida la concentración de un control comercial de albúmina bovina de 22.0 mg/dL y 11.0 mg/dL, adicionando a 1.0 mL del control 3.0 mL, de ácido sulfosalicílico homogenizando y dejando reposar 5 minutos la solución; leer a 620 nm en el espectrofotómetro Coleman JR 6/32. Se determinó la concentración de albúmina a partir de un control comercial de albúmina humana de la compañía Beckman a 2 concentraciones de 7.29 y 58.37 mg/dL por ambos métodos (turbidimetría con ASS y Nefelometría) en cada corrida de las muestras de orina.

### 3.11 ESTANDARIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO

3.11.1 Barrido. Se procedió a encender el espectrofotómetro dejando que se estabilizara por 30 min. Se calibró con un blanco de reacción (partes iguales de solución salina con ácido sulfosalicílico) a cero de absorbancia. Con un estándar de 150 mg/dL se seleccionó la longitud de onda, realizando las lecturas pasando por la luz UV, Visible.

3.11.2 Interferencia de color. A una muestra por duplicado de orina (clara,

mediana y oscura) se les adicionó 3.0 mL de solución salina y se procedió a realizar un barrido con cada una de ellas. Se observó la longitud de onda a la cual pueden absorber color los pigmentos de la orina.

3.11.3 Curva de Calibración. En un tubo de ensaye de 13 por 100 mm se adiciona 1.0 mL de cada uno de los estándares secundarios, cuya preparación se describió en el punto 2.9.4, más 3.0 mL de reactivo de ASS (ácido sulfosalicílico) y se midió en el espectrofotómetro por turbidez a la longitud de onda seleccionada. Se determino la sensibilidad analítica, rango de medición, el coeficiente de correlación para obtener la linealidad,

3.11.4 Imprecisión. Se realizaron corridas de dos concentraciones distintas del control comercial de 22.0 y 11.0 mg/dL (20 muestras de cada concentración) en un día y en 25 días diferentes.

3.11.5 Inexactitud. Definida como la diferencia entre el valor real y la media de un conjunto de valores (algunos autores lo llaman error sistemático), o por medio del coeficiente de inexactitud  $[(\text{inexactitud} / \text{valor teórico}) * 100]$ . También se ha mencionado una forma de inexactitud al error aleatorio obtenido de 3 DS en una corrida de 20 muestras de una control comercial de albúmina de concentración conocida.

3.11.6 Limite de detección. Se determinó con la curva de calibración y el blanco de reacción realizando una corrida de 10 muestras del blanco obteniéndose 3 desviaciones estándar (S).

3.11.7 Especificidad analítica. Se realizó la determinación de la concentración de

microalbuminuria en una corrida de 10 muestras de orina de pacientes por duplicado con datos de una cruz y huellas de sangre en el examen general de orina. Se midieron dos alícuotas de cada una de las muestras, una de ellas no se centrifugó para no precipitar los glóbulos rojos y la otra se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos, en ambas se continuó el procedimiento ya descrito por el método de prueba.

3.11.8 Índice de Recuperación. Se determinó la concentración final de albúmina en ocho muestras a las cuales se les adicionó una concentración conocida de albúmina.

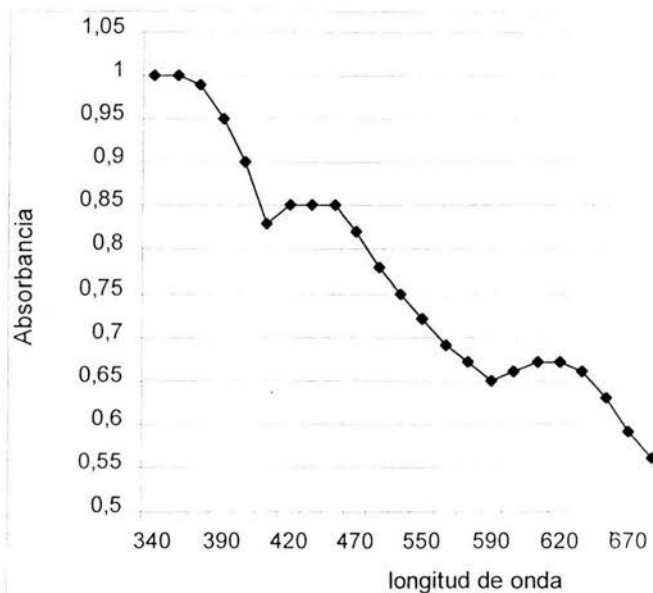
3.11.9 Método de Comparación. Para obtener la correlación se analizaron 96 muestras de orina en el espectrofotómetro Coleman Jr 6/32 ASS al 3.0 % previamente centrifugadas y por Nefelometría (ver anexo A).

## CAPÍTULO IV

## RESULTADOS

Para la implementación y estandarización del método fue necesario conocer el fundamento de la reacción y el producto final para seleccionar la longitud de onda, la cual se lee en el espectrofotómetro mediante un barrido, los resultados se presentan en la gráfica 1, donde se puede observar que hay dos longitudes de onda óptimas en las que se puede realizar la lectura, la de 450 nm y la de 620 nm.

GRÁFICA 1. BARRIDO PARA LA SELECCIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA

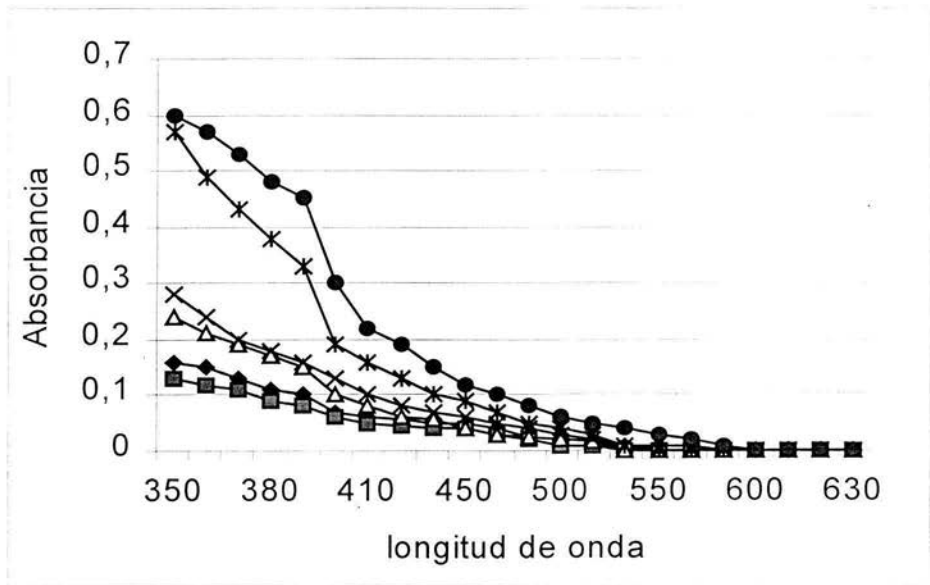


El espectro de absorción muestra dos posibilidades de longitud de onda para leer la albúmina a 450 nm y a 620 nm.

Ya obtenidas las posibles longitudes de onda se realizó la determinación de interferencia del color en muestras de orina a diferentes tonalidades de color amarillo para obtener la longitud de onda óptima en la cual no se presente absorción de luz por pigmentos presentes en ella. En la gráfica 2 se evaluaron

muestras de orina de diferentes tonalidades del color amarillo y se observa que a mayor tonalidad del color amarillo hay mayor absorbancia.

GRÁFICA 2 INTERFERENCIA DEL COLOR EN LA ORINA



Los pigmentos presentes en la orina absorben luz a 450 nm, en cuanto a 620 nm no se observa, demostrando que la longitud de onda óptima es a 620 nm.

Siguiendo la secuencia descrita en el capítulo anterior se procedió a realizar una curva de calibración con un patrón primario para observar la linealidad. Los valores de la curva patrón se presentan en el cuadro 2.

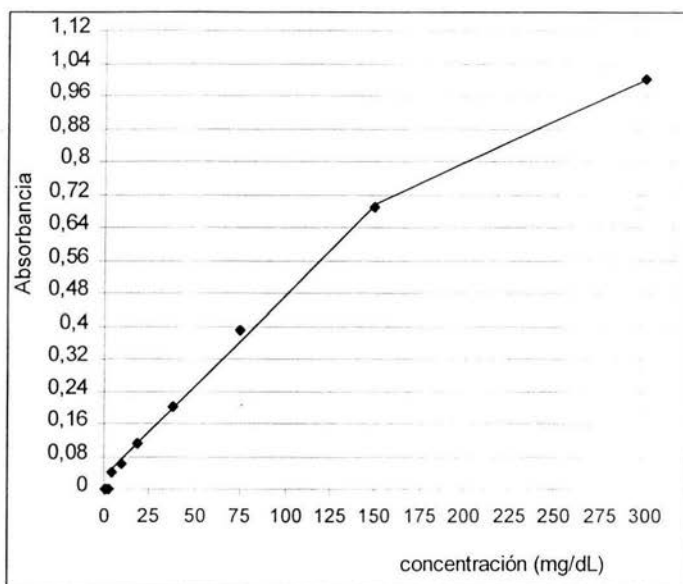


CUADRO 2. CONCENTRACIÓN VS ABSORBANCIA DE LA CURVA  
ESTANDAR A DILUCIONES SERIADAS

Concentración (mg/dL)	Absorbancia
300.00	1.0
150.00	0.69
75.00	0.39
37.50	0.21
19.75	0.11
9.37	0.06
4.68	0.04
2.34	0.00
1.17	0.00

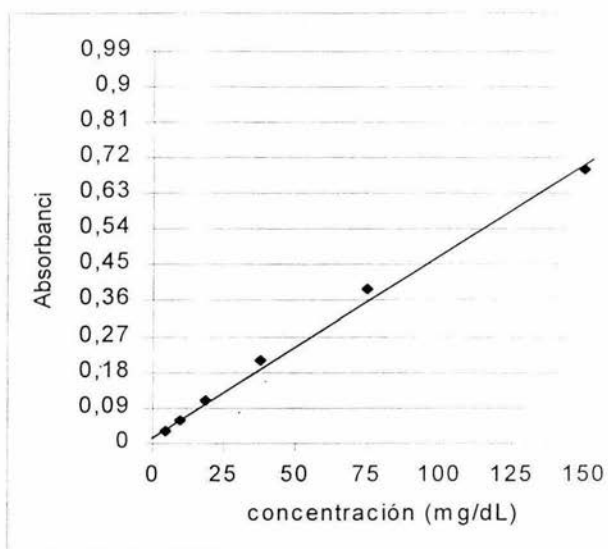
La gráfica 3 muestra las desviaciones en la linealidad de la curva estándar a valores de superiores de 150mg/dL e inferiores a 4.68 mg/dL. En la gráfica 4 se presenta la curva estándar de trabajo de donde se obtienen los datos de sensibilidad analítica, rango de medición, limite de detección, coeficiente de correlación que se muestran en el cuadro 3.

GRÁFICA 3. CURVA DE CALIBRACIÓN DE LA ALBÚMINA BOVINA



El rango de medición donde se cumple con la ley de Lambert-Beer es de 4,68 a 150 mg/dL.

GRÁFICA 4. CURVA ESTÁNDAR DE TRABAJO DE ALBUMINA BOVINA



El coeficiente de correlación obtenido es de 0.998

CUADRO 3. DATOS DE SENSIBILIDAD ANALÍTICA, RANGO DE MEDICIÓN, LIMITE DE DETECCIÓN Y COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR

Sensibilidad analítica (mg/dL)	4.68
Rango de medición (mg/dL)	4.68 a 150
Límite de detección (mg/dL)	+/- 0.9032
Coefficiente de correlación	0.998

Continuando con la secuencia descrita en el CAPÍTULO III, se determinó la imprecisión intra e intercorrida con un control comercial de albúmina bovina a 2 diferentes concentraciones, el cual presenta coeficientes de variación aceptables tal como lo muestra el cuadro 4

CUADRO 4. IMPRECISION INTRA E INTERCORRIDA

Imprecisión	Concentración (mg/dL)	+/-DS (mg/dL)	% CV
intracorrída	11	0.634	5.55
	22	0.501	2.22
intercorrída	11	0.804	7.17
	22	1.070	4.81

Los valores de CV intra e intercorrída son inferiores a 10 % lo cual es aceptable.

De igual manera se determinó la imprecisión de un control de albúmina humana a una concentración de 0.85 mg/dL por nefelometría mostrando un CV de 2.32% intracorrída y 2.9 intercorrída.

El cuadro 5 expresa la inexactitud del método definido como coeficiente de inexactitud. De igual forma puede ser definida por medio del error sistemático (ES) y el error aleatorio (EA).

CUADRO 5. INEXACTITUD

Concentración (mg/dL)	Coefficiente de inexactitud (%)	ES (mg/dL)	EA (mg/dL)
11.00	3.84	0.42	2.32
22.00	2.50	0.56	1.50

La inexactitud es mayor en la concentración menor

Durante el estudio se determinó la concentración de un control comercial de albúmina humana (de Beckman) en cada corrida de las muestras a 2 diferentes concentraciones como controles del proceso, los resultados se muestran en el cuadro 6.

CUADRO 6. CONTROL DE CALIDAD DE 2 CONCENTRACIONES  
DIFERENTES DE ALBUMINA HUMANA

Concentración mg/dL	Turbidimetría con ASS CV (%)	Nefelometría CV( %)
Precisión intracorrida		
7.29	6.35	1.62
58.37	2.35	1.43
Precisión intercorrida		
7.29	9.21	3.12
58.37	4.70	2.95
Se observa mayor precisión con el método nefelométrico, sin embargo el CV del método turbidimétrico es aceptable.		

En la ESPECIFICIDAD ANALÍTICA es importante decir que la cuantificación de albuminuria se ve afectada por la presencia en orina de proteínas diferentes a la albúmina, como la hemoglobina incrementándose en al menos 10 mg/dL; así como leucocitos, dando valores ligeramente elevados generando posibles falsos positivos. Se recomienda por tal razón realizar la determinación cuando no haya datos de infección en vías urinarias.

La capacidad de recuperación del analito por el método turbidimétrico con ASS por medio del índice de recuperación es buena tal como lo muestra el cuadro 7.

CUADRO 7. ÍNDICE DE RECUPERACIÓN

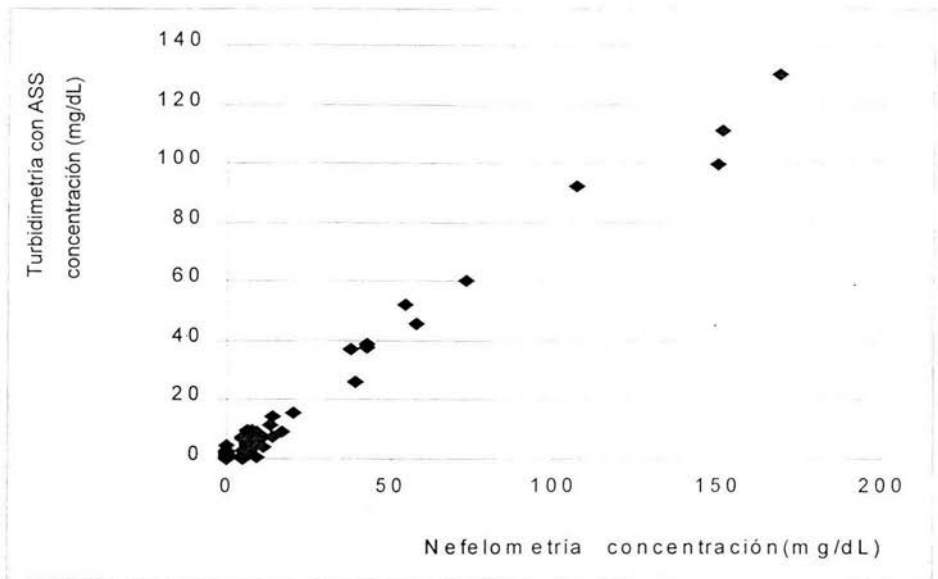
Concentración de la muestra (mg/dL)	Concentración del estándar de albúmina adicionada (mg/dL)	Concentración teórica [esperada] (mg/dL)	Concentración experimental [obtenida] (mg/dL)	Índice de recuperación (%)
150.00	75.00	225.00	221.40	98.40
37.00	75.00	112.00	107.68	96.14
11.00	75.00	86.00	78.75	91.57
13.60	37.50	51.10	45.99	90.00
10.00	37.50	47.50	40.06	84.34
10.00	18.75	28.75	23.70	82.45
10.00	9.37	19.37	15.75	81.31
5.00	4.68	9.68	7.79	80.60

Se observa que a concentraciones bajas de muestra y estándar se obtiene menos recuperación del analito.

Una vez estandarizado el método turbidimétrico con ácido sulfosalicílico se procedió a correlacionarlo con el método de referencia Nefelométrico, en el cual los datos teóricos muestran una correlación de 0.99 con el método de RIA. Para la correlación se utilizaron 96 muestras de orina obteniéndose una coeficiente de correlación de 0.964, la gráfica se presenta a continuación.



GRÁFICA 5. CORRELACIÓN DEL MÉTODO TURBIDIMÉTRICO CON ÁCIDO SULFOSALICÍLICO Y EL DE REFERENCIA (NEFELOMETRÍA).



Se observa la correlación de 96 muestras de orina analizadas por ambas metodologías. Mostrando un coeficiente de correlación de 0.964.

Conforme al Teorema de Bayes se hicieron los cálculos de SENSIBILIDAD NOSOLÓGICA, ESPECIFICIDAD NOSOLÓGICA, VALOR PREDICTIVO POSITIVO, VALOR PREDICTIVO, que nos sirven para evaluar la capacidad del método de prueba para distinguir a los pacientes que presentan la microalbuminuria de quienes no la presentan, por lo que no se consideraron para tal efecto los pacientes con macroalbuminuria; es decir concentraciones

superiores de 20 mg/dL por ambos métodos, ya que están en etapa de nefropatía clínica no reversible, los datos del teorema de Bayes se muestran en el cuadro 8 y en el cuadro 9 se presentan los resultados de sensibilidad y especificidad nosológica, VPP, VPN y eficiencia. La edad promedio de los pacientes fue de 63 años con una población femenina del 56.3% y 43.7 % masculina.

CUADRO 8. CORRELACIÓN DEL MÉTODO TURBIDIMÉTRICO CON  
ÁCIDO SULFOSALICÍLICO CON EL MÉTODO NEFELOMÉTRICO

Método de prueba	Método de referencia			
		Enfermedad		
	Resultado	Presente	Ausente	Total
	Positivo	21	8	29
	Negativo	7	48	55
Total	28	56	84	

Se presentan la correlación de los datos obtenidos en ambas metodologías en 84 muestras de pacientes con albuminuria inferior a o igual a 20 mg/dL

CUADRO 9. DATOS DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD NOSOLÓGICA, VPP, VPN Y EFICACIA EN 84 MUESTRAS CON RESULTADO EN AMBOS MÉTODOS DE ALBUMINURIA INFERIOR O IGUAL A 20 MG/DL.

Sensibilidad nosológica (%)	75.00
Especificidad nosológica (%)	85.71
VPP (%)	72.41
VPN (%)	87.27
Eficiencia (%)	82.14

## CAPÍTULO V

### DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La cuantificación de microalbuminuria es de suma utilidad para el diagnóstico de nefropatía diabética incipiente en el paciente con diabetes mellitus, ya que la proteinuria no es la enfermedad sino un marcador clínico que favorece el diagnóstico oportuno (50), como lo mencionan diversos autores. Sin embargo, es importante contar con técnicas de laboratorio confiables, estandarizadas, validadas, que permitan su detección y así facilitar el pronto tratamiento del paciente. En el presente estudio se ha realizado la estandarización y validación de una técnica turbidimétrica con ácido sulfosalicílico, con la finalidad de aportar una alternativa de diagnóstico para el laboratorio clínico. La utilidad de este procedimiento radica en que es un método sumamente sencillo y de fácil implementación para cualquier laboratorio de análisis clínicos, que cuente con lo básico.

Fundamentada inicialmente en la reacción de punto final cuando la albúmina precipita por acción del ácido sulfosalicílico, y en la propiedad del bloqueo de la luz cuando esta incide sobre las partículas del precipitado formado, se produce una lectura en el espectrofotómetro (27 - 35). Siguiendo con el principio de la ley de Lambert-Beer, se determinó la longitud de onda óptima. Durante la selección de longitud de onda óptima se encontraron dos posibles longitudes de onda en las cuales se podía leer la albúmina (Gráfica 1), pero considerando que la orina no es un líquido transparente debido a que en ella se pueden encontrar pigmentos que pueden absorber la luz y dar resultados erróneos, se procedió a realizar la interferencia de color de la orina, seleccionando 18 muestras de

diversas tonalidades del color amarillo el análisis se realizó similar al de la selección de longitud de onda óptima en el campo UV y visible. Se encontró que la mejor longitud de onda es a 620 puesto que ninguna de las muestras analizadas mostraron absorción de luz sin embargo, a 450 nm se observó una ligera absorción de luz (Gráfica 2), por lo que se eligió para el procedimiento la longitud de onda de 620 nm, con lo que se eliminó la interferencia producida por el color natural de la muestra que es necesaria analizar.

Posteriormente se realizó la curva de calibración a partir de un patrón primario de albúmina (Cuadro 2), para determinar si hay linealidad conforme a la ley de Lambert-Beer; comprobando esto por el coeficiente de correlación de 0.998, lo que indica una buena linealidad (Gráficos 3 y 4; Cuadro 3), y así dar validez a la medición de las concentraciones de las muestras que se analizaron. Con esta misma curva se determinó la sensibilidad analítica, el rango de medición, y el límite de detección del blanco (Cuadro 3). Los valores obtenidos dan una posibilidad de evaluar a los pacientes con inicio de daño renal en fase de microalbuminuria, puesto que los niveles de concentración encontrados van desde 4.68 mg/dL lo que permite que se detecte a tiempo el inicio del daño renal el cual es aún un proceso reversible con el cuidado del paciente y un tratamiento adecuado. Aunque este método no da la posibilidad de detectar niveles inferiores a 4.68, sí da la viabilidad de dar al paciente un tratamiento que permita su recuperación. El rango de medición de 4.68 a 150 mg/dL es muy amplio, lo que permite en un momento dado verificar el grado de proteinuria con la tira reactiva

cuando haya 1 cruz o huellas, ya que al ser la tira reactiva una técnica en la que se determina cualitativamente la proteinuria, se ve afectada por la percepción, experiencia y sagacidad del analista. Ya obtenidos los datos de la curva de calibración se procedió a realizar la imprecisión para ver el grado de discordancia de los valores (18) y la inexactitud analítica del procedimiento en concentraciones de 11.0 y 22.0 mg/dL, obteniendo valores aceptables en la imprecisión analítica tanto intra como intercorrida (Cuadro 4), ya que se recomiendan valores de CV inferiores a 10% (41, 42). De igual manera la inexactitud del método se considera buena puesto que el valor no se aleja demasiado del valor real (Cuadro 5).

La curva estándar se realizó diariamente hasta el final del análisis mostrando reproducibilidad en los datos en cada determinación. Cabe señalar que al realizar la determinación nefelométrica del calibrador de albúmina bovina este no fue reconocido por el anticuerpo empleado como reactivo en este equipo, por lo que se realizó la determinación intra e intercorrida de un control comercial de albúmina humana proporcionado por la compañía Beckman (misma a la cual pertenece el Nefelómetro Array 360) como control de calidad, no así para los datos de estandarización y validación (cuadro 6). Cabe señalar que el método no es específico para albúmina exclusivamente puesto que el ASS es capaz de precipitar otras proteínas diferentes que se encuentren en la orina sin embargo, en la nefropatía incipiente la primer proteína excretada en orina es la albúmina, debido a que su peso molecular es menor a las demás, pero a medida que el daño

en el riñón avanza no solo se elimina la albúmina, sino otras mas y el daño ya no es incipiente. En el índice de recuperación el grado de pérdida del analito es aceptable ya que no es tan grande aún a concentraciones bajas (Cuadro7).

Cuando se evalúa un nuevo procedimiento es importante considerar los criterios de confiabilidad, tal como se han realizado y analizado en este trabajo para garantizar la calidad del resultado del análisis. Por tal motivo, es importante la correlación del método turbidimétrico con ácido sulfosalicílico con el método de Nefelometría representado en la gráfica 5 (donde el dato teórico del coeficiente de correlación del método nefelométrico vs RIA es de 0.99) cuyos datos de sensibilidad y especificidad, VPP y VPN son aceptables como prueba de tamizaje, la eficiencia expresada de 82.14% indica el porcentaje de pacientes que se clasificó correctamente. Esto hace que se garantice un buen resultado para diferenciar a la población con riesgo de desarrollar daño renal progresivo e irreversible y de la posibilidad de dar un tratamiento oportuno. También se realizó la determinación del valor normal de excreción de albúmina en la orina por micción matinal con un grupo control de 34 personas sanas, ya que el valor normal de referencia que se tenía era de un grupo de personas de California (EU), y no se contaba con datos en México (ver Anexo B).

El método turbidimétrico con ASS presenta algunos falsos positivos sin embargo, para el diagnóstico como ya se ha mencionado anteriormente la ADA recomienda 2 de 3 muestras positivas en un lapso de 3-6 meses asegurando un diagnóstico correcto.



En el caso de los falsos negativos, como es un procedimiento fácil de implementar y de fácil ejecución permite su realización a gran escala, por lo que quizás, al ser el paciente diabético un individuo que mensualmente suele practicarse análisis de rutina en mediciones repetidas se obtenga el resultado correcto y se someta al tratamiento correctivo.

CAPÍTULO IV  
CONCLUSIONES

Este trabajo ha expresado la necesidad de contar con una técnica estandarizada, practicable, confiable y accesible, en cualquier laboratorio de atención primaria de salud, que cuente con un espectrofotómetro básicamente, el reactivo es muy económico; es así como se ha desarrollado este método. Al ser un método económico (\$0.50 de reactivo) y fácil de procedimiento da la oportunidad de realizarse en prácticamente cualquier laboratorio de análisis clínicos, en aquellos que no cuenten con equipos automatizados como los inmunoquímicos que son métodos exactos, y precisos, pero inaccesibles y de gran costo

Para ello se han realizado la evaluación de los parámetros de confiabilidad del método turbidimétrico con ácido sulfosalicílico para cuantificar microalbuminuria, los valores obtenidos son aceptables dado que los resultados lo demuestran, asimismo hay una buena correlación con el método de referencia (Nefelometría) lo que garantiza que los resultados obtenidos por el método turbidimétrico con ácido sulfosalicílico sean confiables.

Esta técnica permite detectar cantidades pequeñas de albúmina en orina que no se detectan generalmente en la tira reactiva empleada en el examen general de orina (dada como proteinuria), permitiendo un diagnóstico precoz del daño renal incipiente pero progresivo.

Como se ha venido mencionando a lo largo de este trabajo la cuantificación de microalbuminuria es un indicador temprano de daño renal, y de monitoreo del deterioro de la filtración glomerular, con el cual se hace posible la atención precoz del paciente. La finalidad de este proyecto se cumple al evaluar el método

de microalbuminuria, pues permite detectar a la mayoría de los pacientes que debido a un padecimiento primario como diabetes mellitus, inician un daño renal incipiente, la intervención oportuna del médico tratante para modificar los hábitos alimenticios del paciente, hacen posible preservar la función renal de los pacientes por mayor tiempo y con ello se abaten el número de pacientes que en etapas tempranas presentan daño renal.

Los insumos requeridos, para la realización del método turbidimétrico con ácido sulfosalicílico son de fácil adquisición y comúnmente se encuentran en los laboratorios de análisis clínicos del primer nivel de atención médica. de igual forma los calibradores como la albúmina sérica bovina también se utilizan en otros ensayos de rutina en los laboratorios clínicos (Baciloscopías por tinción ácido alcohol resistente, control en el grupo sanguíneo, medio proteico en las pruebas cruzadas) lo que verdaderamente hace a esta metodología un procedimiento fácil de implementar. La principal limitante en este estudio es la adquisición de la albúmina bovina cristalizada para la creación de la curva estándar y estandarización del método.

## ANEXOS Y GLOSARIO

## ANEXO A

### DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO ANALÍTICO. MÉTODO NEFELOMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE MICROALBUMINURIA.

FUNDAMENTO: El método mide la velocidad de aumento de la luz dispersada producida por las partículas suspendidas en la solución de complejos formados por la reacción antígeno-anticuerpo.

MATERIAL BIOLÓGICO: Primera orina de la mañana centrifugada

#### REACTIVOS:

- Anticuerpo de albúmina humana con azida sódica como conservador.
- Diluyente
- Control para proteínas en orina Beckman Coulter.
- Calibrador Beckman Coulter para proteínas en orina UCAL.
- Calibrador 3 para exceso de antígeno.

#### MATERIAL DE LABORATORIO Y EQUIPO:

- Gradillas para tubos.
- Micropipetas de 250 mL.
- Tubos de ensayo Microtube
- Nefelómetro Beckman Array 360 protein system, de manufactura americana.

## PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN EN EXCESO DE ANTÍGENO

Se prepara una dilución 1:216 del calibrador 3 en dos pasos:

- a) Solución 1 (disolución 1:36): 20 mL del calibrador 3 con 700 mL del diluyente B. Se mezcla perfectamente por inversión y se debe evitar la formación de espuma.
- b) Solución 2 (dilución 1:6): 100 mL de solución 1 con 500 mL de diluyente. Se mezcla perfectamente por inversión teniendo cuidado de no formar espuma.

## REACTIVOS:

MICROALBÚMINA. El reactivo de microalbúmina (anticuerpo) para uso de los autoanalizadores de proteínas específicas Beckman conjunto con su calibrador es utilizado para la determinación cuantitativa de micro cantidades de albúmina en orina. Se emplean reactivos de un solo lote.

## PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

Se toma una alícuota de la primera orina de la mañana, se centrifuga a 3,000 rpm por 5 minutos. Del sobrenadante se toman 250 mL de la muestra, se le coloca en el pocillo de la bandeja de muestras y el anticuerpo de microalbúmina en la bandeja de reactivos.

## CONTROL DE CALIDAD DEL PROCESO

Se determinó en cada corrida la concentración de un control para proteínas en orina nivel 1 (0.67-1.03) y se lee en el Nefelómetro Beckman Array 360 protein system.

## PRECISION

Se determinó la concentración por el método nefelométrico en una corrida de 20 muestras de un control comercial de albúmina humana a una concentración de 0.85 mg/dL obteniéndose un CV intracorrída de 2.32 % y 2.9 % intercorrída.



## ANEXO B

El valor normal de excreción de albuminuria por nefelometría es inferior a 1.9 mg/dL reportado para la población de California sin embargo, es conveniente determinar el valor normal en población Mexicana.

Para ello se cuantificó albuminuria en una población voluntaria y sana de 34 personas de 30 a 60 años, del personal que trabaja en la Unidad de Medicina Familiar No. 4 del IMSS. Se les solicitó una muestra de orina (la primera de la mañana, por micción media), se incluyeron todas, excepto aquellas con datos de infección en vías urinarias y de mujeres menstruando. Las 34 muestras se determinaron por ambos métodos.

El valor de referencia es definido como:

$$VR = \bar{X} + 2DS$$

El valor normal de albúminuria obtenido por nefelometría es inferior a 1.98 mg/dL, en cuanto al método turbidimétrico con ácido sulfosalicílico el valor obtenido en las muestras fue inferior a 4.68 mg/dL. Por lo que podemos referir a estas personas como normoalbuminúricas.

## GLOSARIO

Albúmina.- Proteína globular sérica sintetizada en el hígado, más abundante en el plasma, cargada negativamente, cumple con funciones de transporte y mantiene la presión oncótica del organismo.

Barrido.- (selección de longitud óptima) Es aquel que se realiza en el espectrofotómetro a diferentes longitudes de onda con la sustancia que se pretende analizar. En nuestro caso se utilizó la región del UV y el visible del espectro (350-670 nm).

Control de Calidad.- Es el procedimiento que permite monitorear la ejecución de un procedimiento de medición con el propósito de una acción correctiva.

Longitud de onda óptima.- Aquella que presenta la absorción de luz máxima sin interferencia de otras sustancias presentes en la misma muestra que absorban la luz a dicha longitud de onda.

Macroalbuminuria.- (proteinuria) Es la excreción de albúmina en concentraciones elevadas (mayores a 20mg/dL).

Microalbuminuria- Excreción de albúmina en cantidades pequeñas pero anormales (2-20mg/dL).

Nefropatía.- Es el daño renal ocasionado por diversas causas, la diabetes es de las principales.

Normoalbuminuria.- Excreción de albúmina urinaria matutina en concentraciones inferiores de 2 mg/dL.

Patrón primario.- Es aquel que se prepara con el analito puro y disolventes simples.

Patrón secundario.- Solución con el analito puro en disolvente simple, con valor asignado para análisis por medio de varios procedimientos de medición calibrados por el estándar primario.

Método de referencia.- Es aquel que tiene error sistemático muy bajo y alta precisión

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

## BIBLIOGRAFÍA

## BIBLIOGRAFIA

1. Guyton AC: Tratado de Fisiología Medica: Mc Graw Hill Interamericana; México 1997
2. Anderson JR: Patología Compendio de Anatomía Patológica y Patología General: Espaxs; España 79
3. Burton DR: Pathophysiology of Renal Disease: Mc Graw-Hill Book Company; USA 1998
4. Boyd W: Introducción al estudio de las enfermedades: Limusa; México 1990.
5. Whitby LG, Smith AF, Beckett GJ: Lecture Notes on Clinical Chemistry: Blackweel Scientific Publications; Reino Unido 1991
6. Guízar JM, et al: Renal Functional Reserve in Patients with and without Microalbuminuric. Nephron 2001; 87: 223-30
7. Ritz, et al: End- Stage Renal Failure in Type 2 Diabetes. Am J Kidney Dis 1999; 34: 795-808
8. Ritz E: Nephropathy in type 2 Diabetes: J Int Med. 1999; 245:111-126
9. Islas AS, Lifshitz GA: Diabetes: Mc Graw-Hill Interamericana; México 1999
10. American Diabetes Association: Diabetic Nephropathy. Diabetes Care 1998; 21(suppl 1): S51-52
11. Kesller MA, et al: Microalbuminuria and borderline-increased albumin excretion determined with a centrifugal analyzer and the albumin blue 580 fluorescence assay: Clin Chem. 1997; 43: 996-1002
12. Cohen M.P, Sherman C.W, Lautenslager G.T: Serum Type IV Collagen in

- Diabetic Patients at Risk for Nephropathy: *Diabetes Care*. 2001; 24:1324-1327
13. Viberti GC, Jarre RJ, Maahmud U, Hill RD, Argyropoulos A, Keen H. Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus: *Lancet*. 1982; 1: 1430-1432.
  14. American Diabetes Association: Tratamiento de la Diabetes Mellitus y sus Complicaciones Grupo Mercadotecnia de Innovación y Desarrollo, SA de CV
  15. Pascale H, Michael W, Steffes E, Michele M: Glomerular Structure in Women With Low Glomerular Filtration Rate and Normal Urinary Albumin Excretion: *Diabetes*. 1992; 41:581-587.
  16. Mogensen CE.: Microalbuminuria as a predictor of clinical diabetic nephropathy: *Kidney Int*. 1987; 31: 673-681.
  17. Consenso para la prevención de las complicaciones crónicas de la diabetes tipo 2. nefropatía diabética. *Rev Invest Clin* 2000; 52 (3): 325-363.
  18. Montgomery R et al: *Bioquímica Casos y Texto: Mosby-Year Book; USA* 1993.
  19. Tood-Stanford: *Patología Clínica y Química Clínica: Panamericana; México* 1993
  20. Mogensen CE, et al: Microalbuminuria and Potential Confounder: *Diabetes Care*. 1995; 18: 572-80
  21. Asociación Latinoamericana de Diabetes: *Complicaciones Renales. Red de la Asoc Lat de Diabetes* 2000. edición extra (suppl 1): 146-48

22. Krupp MA, Tierney LM, Jawetz E, Camargo CA: Manual de Diagnóstico Clínico y de Laboratorio: El Manual Moderno; México 1985.
23. Oppenheim IA: Manual para técnicos de laboratorio: Panamericana; México 1988.
24. Instituto Mexicano del Seguro Social: Manual de Procedimientos del Laboratorio Clínico; México 1974.
25. Kaplan L, Pesce A: Química Clínica Métodos: Panamericana; Buenos Aires 1990.
26. Kaplan L, Pesce A: Clinical Chemistry, theory analysis and correlation: Mosby Company; USA 1984.
27. Braun RD: Introduction to Chemical Analysis: Mc Graw-Hill; Singapore 1985.
28. Ediciones Científicas y Técnicas SA: Diagnóstico y Tratamiento Clínicos: Masson Salvat; España 1993.
29. Pickering WF: Química Analítica Moderna: Reverte; España 1980.
30. Jeffery GH, Basset J, Mendham J, Denney RC: Textbook Quantitative Chemical Analysis: Longman Scientific and Technical; Great Britain 1989.
31. González de Buitrago JM, et al: Bioquímica Clínica: Mc Graw-Hill; España 1998.
32. Harris D: Análisis Químico Cuantitativo: Reverte; España 2001.
33. Henry R: Diagnóstico y Tratamiento Clínico por el laboratorio: Masson-Salvat; México 1997.

34. Kaplan L, Pesce A: Química Clínica: Técnicas de laboratorio. fisiopatología. métodos de análisis: Panamericana; Buenos Aires 1988
35. Flashka HA, Bernard AJ, Sturrock PE: Química Analítica Cuantitativa: Compañía Editorial Continental; México 1969.
36. Tietz N, Wendewll T, Freier E, Kachamar J, Rawnsley H: Fundamentals of Clinical Chemistry: WB Saunders Company; Canada 1970.
37. Stites DP, et al: Inmunología Básica y Clínica: Manual Moderno; México 1998
38. Fundenberg H, Stites D, Caldwell J, Wells V: Inmunología Clínica: El manual Moderno; México 1982.
39. Castillo, et al: Mejoría Continua de la Calidad: Medica Panamericana; México 1995.
40. González de Buitrago JM: Tecnología y Métodos del Laboratorio Clínico: Salvat; México 1992.
41. Thakkar H, et al: Development and validation of a particle-enhanced turbidimetric inhibition assay for urine albumin on the Dade aca analyzer: Clin Chem. 1997; 43: 109-113.
42. Sacks, et al: Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the diagnosis and Management of Diabetes Mellitus: Clin Chem. 2002;48: 436-72
43. Office Practice of Laboratory Medicine: The Medical clinical Of north America Vol. 71.WB Saunders Company; USA 1987.



44. Riffenburgh RH: Statistics in Medicine: Academic Press; USA 1999
45. Wayne D: Bioestadística: Bases para el Análisis de las Ciencias de la Salud: Limusa; México 1987.
46. Instituto Mexicano del Seguro Social: Metodología de la Investigación Clínica: México 1984.
47. Rea-Castañeda R, Gutiérrez-García JN, Díaz-Mejía GS, Kobashi-Sánchez NS, Castro-Hernández P: Estructuración de los capítulos del protocolo e investigación según el tipo de estudio: Rev Sanid Milit; México 1987.
48. Rea-Castañeda R, Gutiérrez-García JN, Kobashi-Sánchez NS, Castro-Hernández P: Paquete de autoaprendizaje para la elaboración de un protocolo de investigación: Departamento del Distrito Federal, Dirección de enseñanza e investigación; México 1988.
49. Henry R: Química Clínica: Principios y Técnicas: JIMS; España 1980.
50. Lawrence M et al: Diagnóstico Clínico y Tratamiento: El Manual Moderno; México 1997.