

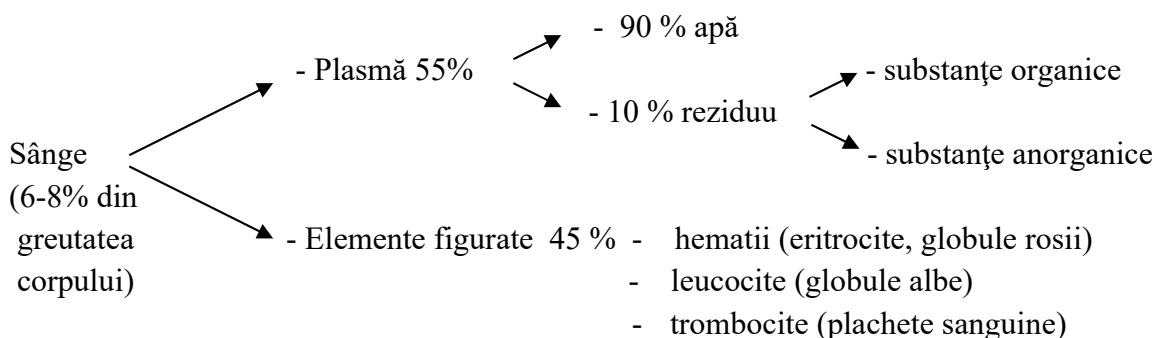
Laborator 3 – Medicină

Materiale biologice folosite la analizele biochimice: compoziție, caracteristici, recoltare. Factorii ce influențează rezultatele analizelor de laborator.

Pentru determinările biochimice se folosesc lichide biologice (sânge, urină, lichid cefalorahidian, salivă, lichide de puncție) provenite de la subiecți umani.

Sângele

Sângele este un țesut lichid circulant cu o compoziție complexă:



Funcțiile sângelui

Sângele îndeplinește în organism funcții importante:

1. Funcția de transport al diferitelor substanțe necesare vieții prin care se realizează:

- respirația - transportă O_2 de la plămâni la țesuturi și CO_2 de la țesuturi la plămâni;
- nutriția - transportă substanțele nutritive absorbite;
- excreția - transportă la rinichi, plămâni, piele, intestin produșii de catabolism;
- reglarea metabolică - vehiculează hormoni, vitamine.

2. Menținerea constantă a parametrilor fizici ai mediului intern (izohidrie, izotonie, izotermie, izoionie, echilibru acido-bazic).

pH-ul sângelui (plasmei) $\sim 7,4$, pH-ul $< 7,35$ – **acidoză**, pH-ul $> 7,45$ – **alcaloză**

Sistemele tampon din sânge sunt:

- hemoglobină (oxihemoglobină)/hemoglobinat (oxihemoglobinat) bazic;
- proteine/proteinat bazic;
- bicarbonat/acid carbonic;
- fosfat monobazic/fosfat bibazic.

3. Funcția imunologică - transportă anticorpi.

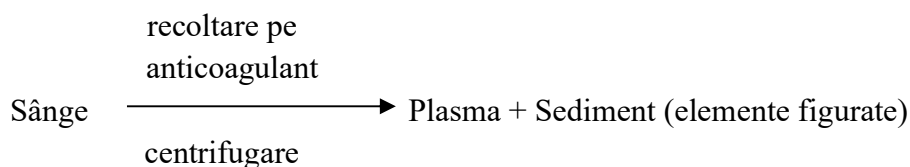
4. Funcția antihemoragică – este implicat în procesul de coagulare.

Recoltarea sângelui

În funcție de modul în care se face recoltarea, din sânge se poate obține plasma sau serul:

sânge $\xrightarrow{\text{coagulare}}$ ser + cheag (fibrină și elemente figurate)

Coagularea constă în transformarea unei proteine din sânge, fibrinogenul, în cheagul de fibrină, insolubil, în prezența factorilor coagulării. În ochiurile rețelei de fibrină sunt reținute elementele figurate. În cascada coagulării, un rol important îi revine ionului Ca^{+2} (factorul IV al coagulării) care intervine în activarea altor factori proteici (trombina, accelerina, convertina etc.).



Anticoagulanții sunt substanțe care împiedică procesul de coagulare acționând prin mecanisme diferite:

- blocarea ionilor de Ca^{+2} : EDTA Na_2 , amestec acid citric-dextroză (ACD), oxalat de potasiu, citrat de sodiu, amestec Wintrobe (oxalat de potasiu și oxalat de amoniu), amestec Fleury (oxalat de potasiu și fluorură de sodiu);
- activarea conformației antitrombinei III favorabile legării de trombină și inactivării acesteia: heparina.

Anticoagulanții trebuie aleși în funcție de determinarea care urmează să fie realizată. Raportul între cantitatea de anticoagulant și cea de sânge este diferit, pentru cei mai folosiți, heparina și EDTA Na_2 , fiind de 0,1 ml la 2 ml sânge.

Atât **serul** cât și **plasma** sunt **lichide de culoare gălbuie**, cu oarecare **transparență**.

Culoarea și aspectul pot fi modificate de prezența în cantitate crescută a anumitor componente:

- hemoglobină – roșcat (**ser hemolizat**);
- bilirubină – galben-brun (**ser icteric**);
- triacilgliceroli – opalescent sau lactescent (**ser lipemic**). Compoziția plasmei este complexă existând mici deosebiri față de cea a serului (ex. serul nu conține fibrinogen).

Cele mai multe analize se realizează pe **sângele total** heparinizat și lichidele separate din acesta, **serul** sau **plasma**. Se poate folosi sângele arterial, venos sau capilar.

Sângele arterial este diferit de cel venos în ceea ce privește **pH-ul, conținutul de O_2 și CO_2 , glucoza, clorul, amoniacul**. Orice alterare a circulației locale sau generale va exagera diferențele între sângele arterial și venos. Sângele arterial este considerat uniform în tot corpul, iar valorile pH-ului, pO_2 și pCO_2 reflectă statusul respirator și metabolic al organismului. Sângele arterial este folosit la determinarea gazelor sanguine. Recoltarea sângelui arterial este limitată la situațiile medicale care necesită puncție arterială.

În alte condiții, se poate practica o puncție a pielii care va furniza un **amestec de sânge arterial, venos și capilar**. Încălzind locul înaintea recoltării se va face o “arterializare” a patului vascular datorită vasodilatării și creșterii fluxului sanguin. Recoltarea sângelui în acest mod este indicată în cazul în care puncția venoasă nu este accesibilă (la persoanele cu arsuri sau care fac chimioterapie), când venele sunt foarte fragile (la persoanele în vârstă sau obeze) sau când această puncție presupune un risc prea mare (la nou născuți și copii).

Exceptând situațiile menționate, pentru determinările de laborator se recoltează **sânge venos** prelevat dimineața pe nemâncate, **à jeun**, ultima masă luată cu aproximativ 12 ore înainte), înainte de începerea activității, ceea ce reflectă statusul bazal al organismului. Valorile unor parametri biochimici pot fi influențate de luarea mesei sau depunerea unei activități fizice înainte de recoltare, precum și de poziția organismului și manevrele făcute la recoltare.

Stresul emoțional poate mări în mod fals numărul celulelor albe, indicând nervozitate și anxietate. Dacă se face numărarea elementelor albe la copii sau nou născuți, trebuie să se țină cont de faptul că tipetele prelungite pot să determine creșterea numărului acestora.

Poziția corpului în timpul recoltării este un factor care contribuie la unele modificări. Deoarece ortostatismul determină mișcarea apei din compartimentul intravascular în cel interstițial, conduce la creșterea concentrației unor parametri biochimici.

Uneori se recoltează sânge la intervale de timp bine determinate pentru a urmări dinamica unor parametri: glucoză, fier, monitorizarea consumului unor medicamente.

Dacă se recoltează sânge pentru **determinarea alcoolemiei** nu trebuie folosit alcoolul la dezinfectarea locului puncției.

Pregătirea și conservarea probelor de sânge

Probele de sânge trebuie centrifugate în 1-2 ore de la recoltare. Dacă s-a recoltat sânge fără anticoagulant trebuie lăsat 20-30 minute în poziție verticală pentru a coagula și apoi centrifugat. Probele se centrifughează aproximativ 10 minute la 2500–3000 rpm. Serul și plasma trebuie îndepărtate de pe cheag sau sediment în 2 ore de la recoltare.

Probele trebuie analizate macroscopic înainte de începerea determinării unui parametru pentru a constata eventualele modificări de culoare sau transparență ce trebuie menționate.

Analizele de laborator trebuie făcute în maxim 4-5 ore de la recoltare (enzimele, glucoza, bicarbonații și potasiul nu sunt stabile la temperatura normală). Dacă nu este posibil acest lucru, probele pot fi păstrate la 2-8°C până la 24 ore. Pentru perioade mai lungi trebuie congelate în cantități mici, deoarece decongelarea și recongelarea nu sunt recomandate.

Erori datorate folosirii serului (plasmei) sanguin necorespunzător. Serul hemolizat este sursă de eroare când se determină parametri care au concentrație intraeritocitară mai mare decât cea plasmatică: lactat dehidrogenază, glucoză, transaminaza AST, etc.

Nu se recomandă analiza serului hemolizat.

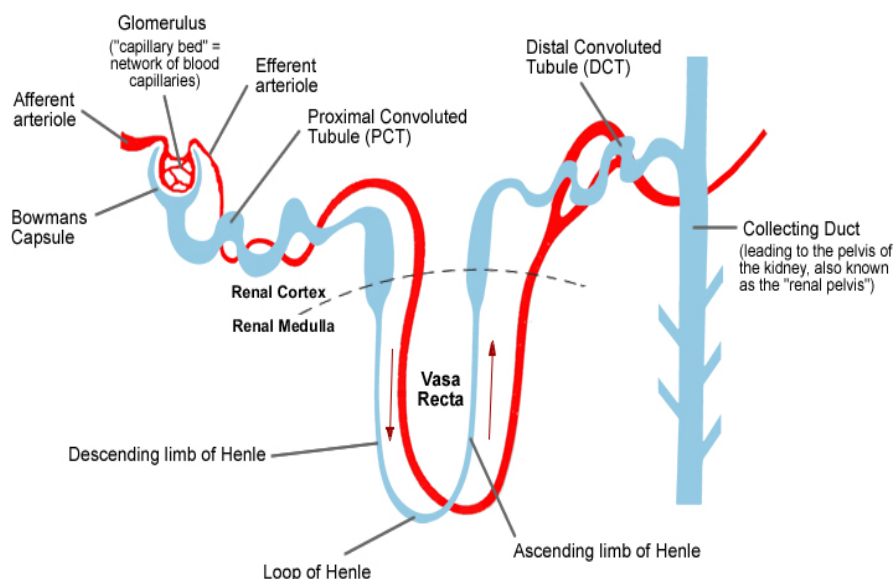
Serul lipemic (opalescent) influențează determinările în domeniul 300-500 nm.

Bilirubina din serul icteric interferează în intervalul 400-500 nm. Pentru a elimina interferențele în ultimele situații trebuie făcute probe martor.

Urina

Urina reprezintă produsul de excreție format în rinichi ca urmare a activității renale prin:

- ultrafiltrare glomerulară care are ca rezultat *urina primară* ce conține aproximativ aceleași componente ca și plasma, într-un volum mare de apă;
- reabsorbție selectivă tubulară, cu rolul de a economisi anumite componente necesare organismului;
- secreție tubulară a substanțelor endogene sau exogene care nu mai sunt utile organismului.



Urina este un lichid biologic cu o compoziție complexă, conținând o serie de substanțe organice și minerale dizolvate într-un volum mare de apă (91-92%).

La nivelul glomerulului renal se filtrează componentele sanguine care au dimensiunile mai mici decât porii membranei glomerulare: apă, glucoză, cataboliți proteici, ioni. Prin filtrul glomerular nu se elimină decât peptide și proteine cu masă mică, care sunt reabsorbite la nivelul tubilor uriniferi, astfel că în urina normală proteinele nu se pot doza prin metodele uzuale.

Glucoza filtrată este absorbită total, în urina normală nedozându-se glucoză. Urina normală nu conține nici lipide, care circulă prin sânge legate de proteine.

În funcție de comportarea lor față de procesele funcționale renale, substanțele existente în sânge pot fi clasificate astfel:

- *substanțe cu prag renal*: glucoza, aminoacizii, proteinele, etc., care se elimină în urină atunci când concentrația lor plasmatică depășește o valoare maximă ce se numește *prag renal* (este depășită capacitatea de reabsorbție a rinichiului).
- *substanțe fără prag renal*: uree, creatinină, coloranți etc., care se elimină în urină în concentrație proporțională cu concentrația lor plasmatică.

Caracteristicile urinii

Aspect. O urină normală se prezintă imediat după emisie limpede și transparentă. Lăsată în repaus câteva ore, apare un depozit floconos, denumit “nubeculum urinae”, care este format din celule de descuamație a căilor urinare sau din celule vaginale la femei.

Aspectul urinii poate fi apreciat ca: limpede, ușor opalescent, tulbure, cu elemente de suspensie, cu depozit. Păstrarea urinii în condiții neadecvate determină modificări ale aspectului: la temperatură prea scăzută urina se tulbură pentru că recrystalizează acidul uric și monouratul de sodiu; păstrată mai mult timp în condiții defectuoase apar depozite de carbonat de calciu și fosfat amoniacomagnezian.

Analiza chimică a unei probe de urină tulbure se execută numai după centrifugarea acesteia.

Culoare. Urina normală are o culoare de un galben deschis până la galben roșcat, datorită prezenței unor pigmenți ca: urocrom, urobilină, porfirine, derivați ai indoxilului urinar. Pigmenții în formă redusă sunt incolori, culoarea urinii depinzând de gradul de oxidare al acestora.

Culoarea urinii este influențată de ora emisiei, prima urină de dimineață fiind cea mai concentrată (deci cu o densitate mai mare) și având o nuanță mai închisă, în timp ce emisiile ulterioare sunt mai decolorate și cu densitate mai mică.

Culoarea este influențată, de asemenea, de pH-ul urinar, urina mai acidă fiind mai închisă, iar cea alcalină mai deschisă, ambele putând avea însă aceeași densitate. Urina este mai închisă la culoare după eforturi fizice, alimentație hiperproteică, stări febrile, datorită concentrării ei (oliguriei) și mai palidă în poliurii, indiferent de natura lor. După ingerarea unor medicamente sau în diverse stări patologice, pot apărea anumite *modificări de culoare* față de starea normală.

Consistență. Urina normală are consistența unei soluții slab saline. Urina care conține albumină prezintă o spumă persistentă, cea cu puroi este filantă, iar aceea care are o concentrație mare de glucide sau unii aminoacizi, siropoasă.

Miros. Urina normală are un miros caracteristic, de migdale amare, datorat acizilor volatili și substanțelor urinoide. Urina de dimineață, mai concentrată, are un miros mai puternic. Urina eliminată după consumul de ceapă, usturoi, hrean, sparanghel are un miros dezagreabil.

Volum urinar. Cantitatea de urină excretată în 24 de ore de un individ sănătos (diureza) este influențată de următorii factori fiziologici:

- a) alimentația, volumul de lichide ingerat;

- b) temperatura și umiditatea mediului înconjurător;
- c) poziția corpului, durata și intensitatea muncii;
- d) exercițiul fizic;
- e) greutatea, vârsta, sexul.

În mod normal, un bărbat de 70 kg, în repaus sau cu o muncă moderată, la un regim hidric echilibrat și locuind într-o climă temperată, elimină 1200 – 1800 ml urină în 24 h, iar o femeie, în aceleași condiții, elimină 1000 – 1400 ml.

Volumele de urină eliminate în cursul nopții și în timpul zilei se găsesc într-un raport numit *nictmeral*, a cărui valoare este în medie 1/3,5. Stabilirea volumului de urină de 24 de ore se face cu un cilindru gradat sau pahar conic gradat.

Densitate. Urina normală este o soluție cu o concentrație cuprinsă între 50-70 g reziduu /l, așa că densitatea va fi mai mare decât a apei, cuprinsă între 1,015 – 1,025 g/cm³, cu limite fiziologice 1,001 – 1,035.

Urina de dimineață, fiind mai concentrată, are o densitate mai mare decât cea din cursul zilei. Densitatea sau greutatea specifică depinde de substanțele dizolvate și anume: diverse săruri și ureea, la indivizii sănătoși, glucoza și albumina, în unele cazuri patologice. Densitatea urinară variază în funcție de aportul alimentar și de cantitatea de lichide ingerate, fiind în același timp diferită la același individ în cursul unei zile, motiv pentru care se stabilește pe urina de 24 h.

pH. În mod normal, urina de 24 de ore a persoanelor care au un regim alimentar mixt prezintă un *pH mediu slab acid*, 6. pH-ul urinar este determinat, în cea mai mare măsură, de raportul fosfați monobazici/fosfați bibazici din urină (raportul acestora este 5:1, față de plasmă unde este inversat). Limitele fiziologice ale acestui parametru sunt între 5 și 8, fiind dependente, în primul rând, de regimul alimentar. În cazul unui regim strict carnat, urina este mai acidă, pH 5,2-5,3, iar în cazul unui regim strict vegetarian sau când se ingeră bicarbonat de sodiu sau ape minerale alcaline pH-ul este 7,0 – 7,5.

Recoltarea urinei

a. Probele recoltate „**la întâmplare**” se folosesc pentru analiza caracteristicilor urinei (pH, densitate, osmolaritate, miros) și a prezenței unor componente patologice (proteine, glucoză, corpi cetonici). Este recomandată recoltarea primei urini de dimineață, pentru că este cea mai concentrată. Vasul trebuie să aibă cel puțin 50 ml, să fie curat, închis etanș și, în cazul determinării bilirubinei sau porfirinelor, protejat de lumină.

b. Urina recoltată „**la timp fix**” se referă la urina recoltată la intervale specifice de timp, de exemplu înainte și după masă, sau la cea recoltată după o anumită perioadă de timp. Se recoltează probe de urină la interval specific de timp pentru determinarea testului de toleranță la glucoză, iar urina de 12 ore sau de 24 de ore pentru dozarea diferiților parametri în urină, deoarece majoritatea dintre aceștia suferă variații diurne (de exemplu, electroliții, catecolaminele, 17- hidroxisteroizii au valori minime dimineața, crescând în timpul zilei).

c. Pentru urocultură se recoltează într-o eprubetă sterilă **urina de dimineață**, de la mijlocul jetului, după o toaletă locală corespunzătoare.

Conservarea urinei

Dacă urina nu este limpede sau dacă este necesară analiza sedimentului urinar și acesta nu este abundent, trebuie mai întâi centrifugată. Dacă analiza nu se face imediat, vasul trebuie păstrat la rece. Dacă este recoltată pentru determinarea bilirubinei sau a porfirinelor, vasul trebuie protejat de acțiunea luminii. Dacă analiza se face după mai mult de 2 ore, urina trebuie păstrată la rece pentru a evita modificarea pH-ului, a glucozei, urobilinogenului și bilirubinei, pentru a preveni autoliza unor elemente celulare și dezvoltarea bacteriilor; unii parametri necesită adăugarea de conservanți.