

Consideraciones metodológicas sobre recogida y almacenamiento de muestras para determinación de aluminio

J. B. Cannata, M. R. Reguera Alvarez, I. Fernández Soto, M. V. Cuesta, A. Noval Vallina * y A. Sanz Medel *

Servicio de Nefrología. Hospital General de Asturias. Facultad de Medicina. Universidad de Oviedo.

* Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias. Universidad de Oviedo.

RESUMEN

Consideraciones metodológicas sobre la recogida y almacenamiento de muestras para determinaciones de aluminio.

Se estudian distintos tipos de tubos de plástico utilizados para determinaciones de aluminio tratados con diferentes concentraciones de ácido nítrico. La utilización de tubos de poliestireno y el pretratamiento con ácido nítrico durante veinticuatro horas se aconsejan como técnicas de elección. Se enfatiza sobre la necesidad de evitar la contaminación para poder obtener resultados fiables.

SUMMARY

Importance of the methodology used in handling aluminium samples.

Different plastic tubes and methods are evaluated. The current polystyrene tubes pre-treated with 10 % nitric acid during 24 hours showed more reliable results. Contamination must be avoided for aluminium results to be used as a useful guide for therapeutical management.

Introducción

En el estudio de la patología que es capaz de inducir el aluminio gran parte de las decisiones terapéuticas se van a basar en una sospecha clínica de intoxicación y en una comprobación analítica de la misma, la que en definitiva va a terminar dependiendo de un número, el que, ya sea expresión de un valor en suero, sangre o hueso, será quien nos dará en la mayoría de los casos el dato final para tomar decisiones de diagnóstico y tratamiento.

Si bien ha costado mucho esfuerzo llegar a barajar cifras que hoy consideramos cercanas a las de «valores normales de aluminio»¹⁻⁷, se puede decir que hoy día ya tenemos unos niveles «guías», de los que podremos sacar el máximo partido si estamos seguros de que ellos representan realmente lo que nosotros creemos.

El qué hoy podamos hablar de cifras probablemente más cercanas a la realidad se debe, fundamentalmente, a una mejor dotación instrumental y a un conocimiento más preciso del papel que juega la contaminación en las determinaciones de aluminio⁸⁻¹⁰. En este mismo número se analizan las características fundamentales de las dos técnicas más utilizadas hoy día en la determinación de aluminio¹¹, y en este trabajo complementario nos vamos a centrar en los aspectos relacionados con la probable contaminación de las muestras, análisis que resulta fundamental si se quieren obtener resultados fiables y a la altura del progreso que hemos alcanzado en los últimos años.

Este avance tecnológico ha desenmascarado y aumentado proporcionalmente la importancia que tiene la contaminación en las determinaciones de aluminio, ya que, por ejemplo, la sola presencia de polvo atmosférico puede, dada la ubicuidad del aluminio, elevar de un modo considerable los valores obtenidos en una muestra.

Con estos niveles de contaminación resulta fácil comprender que la recogida y almacenamiento de las muestras sea hoy día uno de los aspectos primordiales a tener en cuenta, si se intenta medir de un modo rutinario la concentración de aluminio en líquidos biológicos, tejidos y soluciones de uso corriente en medicina.

En una recogida de muestras las fuentes de contaminación de aluminio pueden ser muchas; las agujas siliconadas y las jeringas de plástico no parecen jugar un papel importante en las extracciones rutinarias de pacientes con insuficiencia renal, en los que se esperan aluminemias superiores a los 20 µg/l., pero sí podrían ser importantes en estudios de población con función renal normal.

Sin embargo, aun en las determinaciones rutinarias de aluminio, los tubos utilizados tanto para la extracción de sangre como para el almacenamiento del suero sí pueden representar una fuente importante de

contaminación y de futuros errores terapéuticos. Desde hace algunos años se sabe que el material de cristal, dado su alto contenido en silicatos de aluminio, no debe ser utilizado, motivo por el que progresivamente se ha ido reemplazando por el de plástico.

Ya en nuestros primeros intentos por definir «concentraciones normales de aluminio» observamos que la cifra de aluminio sérico se puede duplicar por el sólo hecho de usar en la recogida y almacenamiento de las muestras diferentes tipos de tubos de plástico^{12, 13}.

Por lo tanto, hoy día, si se quiere determinar aluminio de forma rutinaria, o más aún con fines de investigación clínica o experimental, es necesario, como primer paso, seleccionar el material más idóneo para la recogida y almacenamiento de muestras para las determinaciones de aluminio. Dada la importancia del particular, en algunos países ya existen comercialmente «sets» especialmente preparados y comercializados para la recolección de muestras para determinación de elementos traza.

En nuestro medio aún no contamos con esa posibilidad, motivo por el que nos propusimos investigar:

A) Durante cuánto tiempo y con qué concentración de ácido nítrico deben ser tratados los tubos que se utilizan en la recogida y almacenamiento de muestras y la par averiguar.

B) Qué tipos de tubo de plástico dentro de los que ofrece el mercado y de uso corriente en medicina eran los más idóneos para utilizar en la recogida y almacenamiento de muestras de aluminio.

Material y métodos

Estudio A: En una primera fase se estudiaron 94 tubos (47 de polipropileno y 47 de poliestireno), con una capacidad de 10 ml/tubo, utilizados corrientemente para la recogida de muestras. Dichos tubos fueron tratados con diferentes concentraciones de ácido nítrico (al 10 y 20 %) y durante diferentes tiempos (doce, veinticuatro y cuarenta y ocho horas), sometidos a tiempos similares de aclarado y a un posterior secado en estufa destinada solamente para el procesamiento de este material. Después de dicho tratamiento todos los tubos fueron llenados con una solución especialmente preparada que contenía 30 µg/l. de aluminio (1,1 µmol/l.). La lectura de dicha solución se comenzó después de haber estado almacenada la misma durante veinticuatro horas en los tubos ya pretratados con ácido nítrico.

Estudio B: Tras haber comprobado que el tratamiento con ácido nítrico al 10 % durante veinticuatro horas era suficiente, el siguiente paso fue familiar nuestro estudio seleccionando qué tipo de tubos de los que se utilizan ya no sólo para la recogida, sino

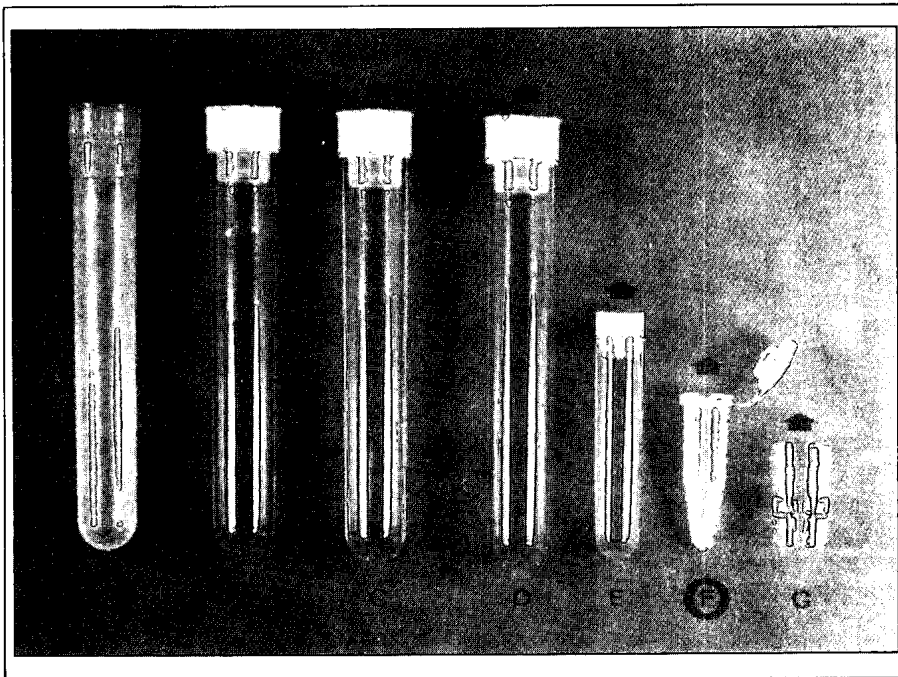


Fig. 1.—Siete variedades de tubos de plástico estudiadas. Grupos A y F (polipropileno). Grupos B, C, D, E y G (poliestireno).

también para la conservación de muestras, eran los más idóneos en nuestro medio.

Estudiamos 84 tubos de siete tipos diferentes de plásticos y de formatos (fig. 1). De cada grupo de 12 tubos seis fueron tratados con ácido nítrico al 10 % durante veinticuatro horas, utilizando la técnica ya reseñada en el estudio A; el resto, los otros seis de cada grupo, no fueron tratados. Los 84 tubos fueron llenados con una solución especialmente preparada que contenía 15 $\mu\text{g/l.}$ de aluminio (0,55 $\mu\text{mol/l.}$).

Las determinaciones de aluminio se realizaron por triplicado, a lo largo de cuatro días, comenzando al día siguiente del llenado de los tubos, utilizando un espectrómetro de absorción atómica (Perkin Elmer 3030) de respuesta rápida, equipado con cámara de grafito y con muestreador automático ¹¹.

Resultados

En el estudio A, en líneas generales, todos los tubos tratados con diferentes concentraciones de ácido nítrico dieron cifras muy cercanas a 30 $\mu\text{g/l.}$ de aluminio (26,9 \pm 1,6 a 32,8 \pm 5,8 $\mu\text{g/l.}$), si bien se observó claramente cómo aumentaba la dispersión de los resultados del día primero al día cuarto de lectura (de 1,3 a 5,8 $\mu\text{g/l.}$). Los tubos de poliestireno tratados con ácido nítrico al 10 % durante veinticuatro horas fueron los que arrojaron valores más cercanos a 30 $\mu\text{g/l.}$ y la prolongación del tratamiento no demostró ningún beneficio.

En el estudio B, en todos los tubos de poliestireno,

A1 ALUMINIO EN DIFERENTES TIPOS DE TUBO

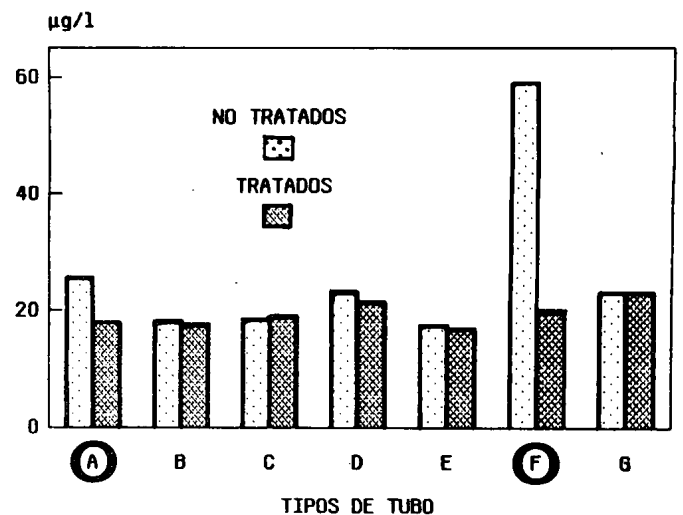


Fig. 2.—Resultados de la lectura de la solución de 15 $\mu\text{g/l.}$ en los siete tipos de tubos estudiados.

las diferencias entre tubos tratados y no tratados fueron mínimas y no significativas. Por el contrario, en los de polipropileno hubo una clara diferencia entre tubos tratados y no tratados, la que fue muy significativa en las cubetas cónicas de plástico (fig. 2), las que son muy utilizadas en nuestro medio para el almacenamiento de muestras.

Por último, nos referiremos a un punto de crucial

importancia en la obtención de resultados fiables en las determinaciones de aluminio, como es la extracción y conservación de las muestras.

Se extraen 5 ml. de sangre en tubos previamente tratados; a continuación se centrifuga la muestra durante veinte minutos a 2.000 revoluciones por minuto, cuantas veces sea necesario para obtener una buena separación; si esto no se consigue tras la primera centrifugación se incuba la muestra a 37° C durante quince minutos, repitiéndose posteriormente el centrifugado. Una vez obtenido el suero necesario se separa el suero, pasándolo a otro tubo tratado, ya sea por decantación o mediante pipeta de plástico dese-
chable.

La muestra de suero obtenido se conserva en nevera a 4° C hasta su lectura, que debe hacerse, en lo posible, dentro de las cuarenta y ocho horas de su extracción.

Discusión

En el momento actual quizá estemos en el umbral de unas décadas en las que nos importará valorar a largo plazo el efecto nocivo de la exposición no masiva, pero si crónica al aluminio. Para ello debemos estar seguros de que lo que estamos midiendo es la concentración real de aluminio y no la concentración real más una parte muy variable, pero importante, aportada por la contaminación.

Ya en nuestros primeros intentos por definir «concentraciones normales de aluminio» en pacientes con insuficiencia renal crónica en nuestro medio comprobamos el papel fundamental que jugaba la contaminación en las determinaciones de aluminio^{12,5, 13}.

Estos resultados confirman nuestros hallazgos preliminares y los de otros autores⁵⁻⁹, demostrando la importancia que tiene una cuidadosa metodología en la cuantificación del aluminio, fundamentalmente en la interpretación de aquellos valores no excesivamente elevados.

Si bien el aluminio se puede analizar en sangre total, plasma y suero, en nuestro medio habitualmente se cuantifica en suero; por lo tanto, para su correcta lectura es necesario obtener sueros límpidos y cristalinos; si esto no se cumple se obstaculiza la lectura de la muestra y los resultados son equívocos.

Esto se observa con mayor frecuencia cuando se extrae la muestra en condiciones posprandiales, debido a la alta concentración lipídica, y también cuando no se permite una adecuada retracción del coágulo, situación muy frecuente en los pacientes con insuficiencia renal crónica, en los que puede quedar fibrinógeno libre, promoviendo la formación de un nuevo coágulo que interfiere con la lectura.

Parece evidente que, al menos con algunos tipos

de tubos de plástico, el pretratamiento previo con ácido nítrico resulta de fundamental importancia, y si bien se pueden utilizar diferentes concentraciones de ácido nítrico y durante diferentes tiempos¹⁴ como procedimiento de rutina, el tratamiento al 10 % durante veinticuatro horas es suficiente para obtener un material adecuado y resulta muy simple de llevar a cabo en el ámbito hospitalario, ya que es simple y económico y no supone más de cincuenta y seis a setenta y dos horas de espera, siendo preferible el pretratamiento en una sola vez de una cantidad de material suficiente para todo el mes.

Si en este estudio se observan los resultados obtenidos con tubos de poliestireno sin tratar, parece evidente que, al menos para el uso rutinario, no sería necesario un pretratamiento previo de los mismos; sin embargo, en lotes previos se han observado resultados más dispares, si bien nunca con tanta variabilidad como la observada en los tubos de polipropileno. Por lo tanto, en casos de emergencia, y si es necesario usar un material sin tratamiento previo, los tubos de poliestireno serían los de elección, dado que han demostrado ser los de menor índice de contaminación. Si se procede así es siempre conveniente guardar tubos de ese lote para que puedan ser «chequeados» como controles para poder corroborar la veracidad de los resultados obtenidos.

Si consideramos que el aluminio está ampliamente distribuido en la naturaleza, y que por ello tiene un gran poder contaminante, comprenderemos con facilidad que un retraso en la lectura de las muestras traiga aparejada una mayor contaminación de origen probablemente atmosférico. Por ello, es aconsejable analizar las muestras dentro de las cuarenta y ocho horas de su extracción, conservándolas en nevera a 4° C hasta el momento de su lectura. No hay acuerdo total sobre las ventajas e inconvenientes de la congelación; si se supone que serán leídas con mucho retraso es aconsejable congelarlas, pero en el caso de sueros no cristalinos la lectura es aún más difícil tras la descongelación.

La concentración de aluminio en cualquier fluido o tejido termina siendo un simple número que será la base sobre la que se fundamentarán tratamientos médicos más o menos prolongados y más o menos costosos. Por lo tanto, un extremado cuidado en la elección y tratamiento del material a utilizar, como asimismo una cuidadosa manipulación de las muestras hasta su lectura, resultan de fundamental importancia.

Como ha ocurrido con otras técnicas, poco a poco nos vamos acercando con mayor precisión a lo que tal vez se puedan considerar «valores normales de aluminio». Sin embargo, este elemento es uno de los más abundantes en la corteza terrestre y presenta mayores problemas que otros para la cuantificación de mínimas concentraciones; por lo tanto, es neces-

rio un contacto más directo entre médicos y analistas para poder beneficiarnos al máximo de la alta sensibilidad alcanzada por la tecnología de la que hoy disponemos y para llegar a obtener resultados más reales, de los que pueden depender importantes decisiones terapéuticas.

Agradecimientos

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la ayuda de la Dirección de Política Científica, Proyecto CAICYT 2837/83 C2.

Bibliografía

1. Zumkley H, Bertram HP y Lison A: Aluminium, zinc and copper concentrations in plasma in chronic renal insufficiency. *Clin Nephrol* 121:18-21, 1979.
2. Tsukamoto Y, Iwanami S y Marumo F: Study of trace elements in patients with chronic renal failure by neutron activation analysis. *Proc Eur Dial transplant Assoc* 16:665-67, 1979.
3. Versieck J, Cornelis R, Andersen KJ y Julshman K: Measuring aluminium levels. *N Engl J Med* 302:468-69, 1980.
4. Gardiner PE y Ottaway JM: Determination of aluminium in blood plasma or serum by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal Chem Acta* 128:57-66, 1981.
5. De Broe M, Van de Viver FL, Bekaert AB, D'Haese P, Paulus G, Visser W, Van Grieken R, De Wolff FA y Verbueken AH: Correlation of serum Aluminium values with tissue aluminium concentration. *Contr to Nephrol* 38:37-46, 1983.
6. Winney RJ, Cowie JF y Robson JS: What is the value of plasma/serum aluminium in patients with chronic renal failure? *Clin Nephrol* 24:Supl 1, S2-S8, 1985
7. Bertran HP, Kemper FH, Müller C, Winterberg B y Zumkley H: Aluminium, copper, zinc and iron contents in blood, plasma, bone and hair of dialysis patients with renal insufficiency. *Trace Elem Med* 2:104-105, 1985.
8. Cornelis R y Schutyser P: Analytical problems related to aluminium determinations in body fluids, water and dialysate. *Contrto Nephrol* 38:1-11, 1983.
9. Fell GS: Accuracy of trace element analysis in biological samples. *Trends in Anal Chem* 3:9, 1984.
10. Cannata JB, Rodríguez Roza R, González Alonso R y Sanz Medel A: Graphite phurnace absorption and ICP atomic emission for the determination of aluminium in biological fluids: a comparative appraisal. *Trace Elem Med* 2:108, 1985.
11. Sanz Medel A, Rodríguez Roza R, Noval Vallina A, González Alonso R y Cannata JB: Técnicas actuales para la determinación de aluminio a niveles de ng/ml. en líquidos biológicos: Comparación costo/efectividad. *Nefrología* 6, 1986 (en este número).
12. Cannata JB: Interpretación de las hiperalbuminurias: ¿Toxicidad o contaminación? *Nefrología* 5:99-100, 1985.
13. Canata JB, Fernández-González L, Serrano M, Reguera R y Sanz Medel A: Importancia de la contaminación en las determinaciones de aluminio. *Nefrología* 5:165-66, 1985.
14. Serrano M, Rosal F, González Alonso R, Reguera R y Cannata B: Tube cleaning for aluminium analysis. Effectivity of different nitric acid concentrations. *Scott Renal Assoc Bull* 6:1, 1985.