Método de determinación de la natremia según test de fragilidad osmótica del eritrocito

DR. JOSE MANUEL DONOSO GONZALEZ *

I.— INTRODUCCIÓN. La terapéutica hidroelectrolítica es uno de los capítulos más importantes de la Pediatría; su adecuado manejo determina la vida, la muerte o el establecimiento de secuelas neurológicas en un determinado paciente.

El tipo de solución a emplear, en este caso de terapéutica está dado fundamentalmente por el tipo osmolar de deshidratación y secundariamente por el equilibrio ácido-básico.

Se ha visto que, corrigiendo el volumen y la osmolaridad, los mecanismos reguladores (respiratorio, renal y endocrino), generalmente corrigen las alteraciones adicionales (4).

De este modo se entiende que el problema más importante que tiene que resolver el médico al iniciar un tratamiento hidroelectrolítico, es el diagnóstico el tipo osmolar de la deshidratación.

Por medios clínicos solamente, este diagnóstico puede ser sólo sospechado y no afirmado con certeza por cuanto ningún hecho de la anamnesis o examen físico es patognomónico de un determinado tipo osmolar de deshidratación, más aún si se considera la existencia de deshidrataciones de tipo mixto, es decir, deshidrataciones hipertópicas con signos clínicos (especialmente dados por su estado de shock) sugerentes de deshidratación de tipo hipotónico.

El laboratorio cobra así decisiva importancia para este diagnóstico y su examen más importante es la natremia.

El sodio es el ión más abundante del extracelular representando más o menos el 90% del total de los cationes; como la mayoría de los aniones plasmáticos son univalentes, dos veces la natremia es igual o más o menos el 90% del total de iones del plasma. Este último valor es una buena esti-

mación de la osmolaridad plasmática ya que los coeficientes osmóticos de los iones en los líquidos orgánicos son aproximadamente 0,93 (ver tabla Nº 1) así, natremia y osmolaridad pueden usarse indistintamente como sinónimos (9) (17) (20).

TABLA Nº 1

COMPOSICION ELECTROLITICA DEL PLASMA
(mEq x Lt. H₂O)

Cationes		Aniones	
Na:	152	Cl:	113
K:	5	HCO ₃ —:	27
Ca:	5	Proteínas	16
Mg:	3	Aniones orgánicos:	6
	—	HCO ₄ =:	2
	165	SO ₄ =:	1
			165

Osmolaridad (mOsm x Lt.) = (Natremia + 10) x 2.

Isonatremia	=	Isoosmolaridad	=	Isotonicidad
Hipernatremia	=	Hiperosmolaridad	=	Hipertonicidad
Hiponatremia	=	Hipoosmolaridad	=	Hipotonicidad.

La determinación de la natremia clásicamente se ha efectuado en forma directa, mediante espectrofotómetros de llama, método que da un adecuado margen de seguridad en sus resultados, pero que implica un aparataje complejo, costoso y de un técnico en su manejo y mantención.

En 1962 Kim, Borges y Holliday (7) demostraron que había una clara correlación entre la natremia y la fragilidad osmótica del eritrocito (F. O.) (ver gráfico Nº 1); estudiando las relaciones entre estos 2 procesos observaron que:

* Médico Becado Universidad Católica de Chile. Cátedra de Pediatría. Hospital Sótero del Río.

GRÁFICO Nº1 VARIACIONES DE LA CURVA DE FRAGILIDAD OSMÓTICA DEL ERITROCITO, SEGÚN OSMOLARIDAD DEL MEDIO INTERNO

- 1) Normalmente había hemólisis en la dilución 0,4% y que su ausencia sugería un estado de hiponatremia.
- 2) Normalmente *no* había hemólisis con la dilución 0,5% y su presencia sugería un estado de hipernatremia.

Partiendo de estos hechos plantearon un posible test de laboratorio para determinar en forma indirecta y cuantitativa la natremia basándose en 3 diluciones del test de F. O.: 1% (dilución control).

0,5%
0,4%

El test de F. O. es uno de los métodos de laboratorio empleados en la investigación de las anemias hemolíticas, ha sido estudiado por diversos autores y resumiendo algunos de sus aspectos tendríamos lo siguiente:

- A. 1) La F. O. se encuentra aumentada en los siguientes estados:
 - a) Esferocitosis
 - b) Anemias hemolíticas adquiridas
 - c) Enfermedad hemolítica del R. N. (por incompatibilidad R. H. ó A. B O).
 - d) Intoxicaciones (10).
 - e) Quemados graves (10)
 - f) Hipernatremia (15) (9) (14) (5)
 - g) Acidosis (1)
- 2) Está disminuida en los siguientes estados:
 - a) Talasemia
 - b) Sicle-cell anemia
 - c) Eritremia
 - d) Anemia ferropriva severa (10)
 - e) Ictericia obstructiva severa (10)
 - f) Esplenectomía (8)
 - g) R. N. (hasta la 4-6 semana de vida) (12) (13) (16)
 - h) Hiponatremia (15) (9) (14) (5).

B) La explicación del cambio de la F. O. asociado a cambios de la osmolaridad del medio interno está en el hecho que el NaCl es un soluto difusible por la membrana celular del eritrocito (a diferencia de la célula muscular) de tal modo que en los estados extremos de cambios de la osmolaridad plasmática (hipernatremia e hiponatremia) el contenido de Na del intracelular se modifica, aumentando o disminuyendo respectivamente. Cuando luego es colocado este eritrocito (hipertónico o hipotónico) en una solución hipotónica (según metódica del test de F. O.), el mayor o menor contenido de soluto no fácilmente difusible lleva a una entrada mayor o menor de H_2O que lo normal en su interior, determinando los cambios ya descritos. (7) (3) (17) (18) (1) (6).

De esta manera, el test de F. O. se convierte en un índice indirecto del contenido total de solutos no libremente difusibles del intracelular, (15) (3).

C) El test de F. O. puede ser realizado de diversas maneras:

- 1) Mediante soluciones salinas hipotónicas a diversas diluciones (Método de Sanford) (8).
- 2) Mediante soluciones salinas hipotónicas tamponadas a pH 7, 4 mediante Buffer fosfato (método de Parpart) (14) (1) (11). La utilidad del empleo de soluciones tamponadas se observa en el gráfico Nº 2 en el cual se demuestra cómo pueden variar los resultados de una misma muestra según el pH de la solución salina empleada.
- 3) Métodos automáticos.
 - a) El Fragilígrafo (2).
 - b) Métodos adaptados a autoanalizadores (4).

Esta investigación está dirigida a evaluar la utilidad del método de la F. O. como un medio de determinación cuantitativo e indirecta de la natremia; se emplean soluciones salinas hipotónicas con y sin buffer, en 3 diluciones (según método planteado por los Dres. Kim y cols.) y 4 diluciones (variante personal del método). Los resultados obtenidos se compararon con aquellos determinados según el método clásico (espectrofotometría).

II. MATERIAL Y MÉTODO. 1.— Se estudiaron a su ingreso, antes de cualquiera terapia hidro-electrolítica, un total de 240 lactantes hospitalizados

con el diagnóstico de diarrea aguda con deshidratación (con o sin vómitos).

2.— En todos los lactantes en estudio, se hicieron determinaciones simultáneas de electrolitos plasmáticos, según espectrofotometría y por el test en cuestión.

Se emplearon espectrofotómetros de llama marca "Eppendorf" y "Jouan", indistintivamente.

3.— De los 240 lactantes:

A) En 121 se emplearon 3 diluciones, según metódica propuesta por Kim y cols., de éstos, en 93 se usaron soluciones salinas hipotónicas y en 28, soluciones salinas hipotónicas tamponadas a pH 7,4.

B) En 119 se emplearon 4 diluciones (variante personal del método) en 26 de estos últimos se emplearon soluciones hipotónicas tamponadas a pH 7,4.

4.— Equipo

A.— Soluciones

Se emplearon soluciones salinas (Na Cl) a diversas diluciones:

Con 3 diluciones:

1% = 171	m. Eq. x Lt. de Na.
0,5% = 85,5	m. Eq. x Lt. de Na.
0,4% = 68,4	m. Eq. x Lt. de Na.

Con 4 diluciones:

1% = 171	m. Eq. x Lt. de Na.
0,5% = 85,5	m. Eq. x Lt. de Na.
0,45% = 76,95	m. Eq. x Lt. de Na.
0,4% = 68,4	m. Eq. x Lt. de Na.

Es necesario establecer que la fidelidad de los resultados obtenidos por este método, depende de la exactitud de las soluciones empleadas, por lo cual ellas deben ser fabricadas en un laboratorio que dé máxima seguridad en su elaboración.

Cuando se emplean soluciones salinas tamponadas con buffer fosfato, las diluciones son las mismas que cuando este agregado no se emplea.

B.— Tubos de ensayo

3 ó 4 según al N° de diluciones que se están empleando.

Si se va a centrifugar la solución, se emplean directamente tubos de centrifuga.

Nota: Todo el equipo que se enumera a continuación (C-D) es optativo.

C.— Equipo para incubar a 37° C las soluciones

Algunos autores (9) (14) han insistido en la importancia de la incubación de las soluciones, para la determinación de la F. O. del eritrocito.

Esto parece ser válido especialmente en aquellas regiones con temperaturas ambientales muy frías.

Sin embargo, aún en esa situación, no es imprescindible su empleo y si no se dispone del material adecuado, basta con posponer un momento la lectura de los resultados por cuanto la temperatura sólo hace variar la velocidad de hemólisis.

D.— Centrifuga

La centrifugación de las soluciones ayuda a obtener resultados más nítidos.

Sin embargo, si no se dispone del equipo apropiado, puede no realizarse, bastando con dejar las soluciones en decantación.

Si se centrifugan las soluciones apenas obtenidas las muestras se obtiene sólo un resultado aproximado (poco nítido), el resultado óptimo se consigue a los 30 minutos o más. (pues la hemólisis se completa a los 30 minutos, con una temperatura ambiental de 20° C.).

En esta experiencia se utilizó una centrifuga marca "Arthur H. Thomas", modelo "CL".

5.— Metódica

A.— Se coloca en los tubos de ensayo (o de centrifuga) 10 cc. de cada dilución.

En otros trabajos (8) (9) (14) (1) se han empleado 3 ó 5 cc. por tubo; en esta experiencia impresionó que se obtenían resultados más fácilmente valorables empleando volúmenes mayores.

B.— Se lleva el soporte con los tubos a la cabecera del paciente. Se obtiene sangre por punción venosa, por medio de una jeringa pequeña.

Se colocan 3 gotas de sangre recién extraída, en cada tubo.

La sangre debe ir en una proporción de 1/100 (2-3 gotas de sangre en 10 cc. sol.). (1) para que el plasma que se añade no altere el equilibrio osmótico de la solución salina.

Se recomienda el empleo de 3 gotas de sangre en 10 cc. de solución, para obtener una intensidad de coloración adecuada.

La sangre debe ser vertida a la solución salina directamente desde la jeringa (sin aguja) para que se forme una gota gruesa y evitar un factor de hemólisis.

Si caen coágulos, pueden alterar los resultados.

C.— Se agitan suavemente los tubos para obtener una mezcla homogénea.

(Esto debe ser hecho con suavidad para evitar hemólisis).

D.— Se deja en decantación por 30 minutos o más.

Los procedimientos que se enumeran a continuación (E-F), son optativos.

E.— Incubación de las soluciones, a 37° C, por 30 minutos. (Se aprovecha este procedimiento para realizar la decantación exigida en D).

Si se ha hecho esto y si las va a centrifugar, se deben volver a agitar suavemente hasta obtener una mezcla homogénea.

F.— Centrifugación, aproximadamente a 2.500 revoluciones por minuto, por 5 minutos.

G.— Se leen los resultados.

III. RESULTADOS. A. La determinación de la natremia, según el test de F. O. simplificado, se realiza dentro de 3 rangos que corresponden a 3 estados clínicos de osmolaridad del medio interno.

Hiponatremia (menos de 120 m. Eq. x Lt.).

Isonatremia (entre 120-150 m. Eq. x Lt.).

Hipernatremia (mayor de 150 m. Eq. x Lt.).

Estos rangos se obtienen observando los diversos grados de hemólisis de las diversas diluciones (como dilución control, con 0% de hemólisis, está la dilución 1%).

Los grados de hemólisis son:

- 1) En el método con 3 diluciones:
(—): color blanco.
(+): color rosado (leve o intenso).
- 2) En el método con 4 diluciones:
(—): color blanco.
(+): color rosado suave.
(++): color rosado intenso.

Analizando cada uno de los rangos clínicos, en conjunto con el gráfico N° 1, tenemos los siguientes resultados:

Isonatremia:

Ver gráfico N° 3.

Hiponatremia:

Ver gráfico N° 4.

Hipernatremia:

Ver gráfico N° 5.

B.— Resultados obtenidos en esta experiencia.

- 1) Empleando método con 3 diluciones:
Sus resultados, analizados según X², demues-

GRÁFICO N° 2 VARIACIONES DE LA CURVA DE F.O. DEL ERITROCITO, SEGÚN PH. DE LA SOLUCIÓN SALINA EMPLEADA EN EL TEST

GRÁFICO N° 3

ISONATREMIA

GRÁFICO N° 4

HIPONATREMIA

GRÁFICO N° 5

HIPERNATREMIA

tran que las diferencias de distribución entre los obtenidos por espectrofotometría y los del test en cuestión (con 3 diluciones), no son fácilmente explicables por acción del azar.

Analizando el gráfico N° 6, tenemos que, además de lo anteriormente explicado, el poder de discriminación de este método, dentro de los diversos rangos, es prácticamente nulo, lo cual puede inducir a error.

2) Empleando método con 4 diluciones:

Sus resultados, analizados según χ^2 demuestran que las diferencias de distribución entre los obtenidos por espectrofotometría y los del test en cuestión (con 4 diluciones) son explicables por acción del azar.

Analizando el gráfico N° 7 se observa que: Los 93 casos se distribuyen en los 9 casilleros de la siguiente manera:

78 en los casilleros de concordancia.

(C, E, G.) (83,9% de los casos)

15 en casilleros de discordancia.

(D, F.) (16,1% de los casos)

Cabe hacer notar que la discordancia (D, F.) se produce en los casos de "Isonatremia" (Catálogos así por espectrofotometría) (4 de acuerdo al test serían Hipernatremias y 11 serían Hiponatremias).

No hay discordancia entre ambas técnicas para los casos de "Hiponatremia" e "Hipernatremia" (según espectrofotometría) (casilleros A-B-H-I).

Con el propósito de ver si la discordancia entre ambos métodos, observado en los casos de "Isonatremia" (según espectrofotometría) era o no efecto del método usado o simplemente debida al azar, se investigó la significación estadística de la discordancia observada, mediante el test de signos (análisis secuencial).

$$Z = \frac{(-1-4/-1)}{\sqrt{4+11}} = \frac{6}{3,86} = 1,55$$

El valor de "Z" encontrado fue de 1,55, cifra inferior a los niveles de significación de 5% y 1% (1,96 y 2,58 respectivamente).

Luego la discordancia observada puede ser explicada por simple azar (dado que se usa una muestra) ya que no hay evidencia estadística suficiente para explicar la diferencia observada por el uso de dos métodos distintos.

3) Si se comparan los resultados al emplear soluciones con o sin buffer (con 3 ó 4 diluciones), se obtiene que en esta experiencia resultó indiferente el empleo de uno u otro tipo de soluciones cloruradas, aunque teóricamente parece más adecuado el empleo de soluciones salinas tamponadas.

IV. RESUMEN Y CONCLUSIONES. Se presenta un método de determinación de la natremia (examen fundamental en la terapia hidroelectrolítica) basado en el test de fragilidad osmótica.

Se concluye, de acuerdo con los resultados analizados que el test de F. O. simplificado, empleando 4 diluciones, es un buen método para la determinación cuantitativa de la natremia, dentro de 3 rangos:

Hiponatremia (menos de 120 m. Eq. x Lt.).

Isonatremia (entre 120 - 150 m. Eq. x Lt.)

Hipernatremia (mayor de 150 m. Eq. x Lt.).

Además del requisito de tener una adecuada correlación estadística, es un método.

- Fácil de realizar.
- Barato.
- Sólo necesita de instrumental básico.
- Rápido.
- Ocupa escasa cantidad de sangre.
- Útil a cualquier edad de la vida con la probable sola excepción de los recién nacidos (el R. N. tiene una doble población de eritrocitos con

respecto a su comportamiento en el test de F. O.; esto es más notable mientras más inmaduro sea el niño y se prolonga hasta las 4-6 semanas de vida).

RESUMEN

Basado en la observación de Kim, Borges y Holliday quienes demostraron que existe una clara relación entre la natremia y la fragilidad osmótica del eritrocito, se investigaron 2 métodos para la determinación del sodio plasmático, uno propuesto por los mismos autores y el otro, una modificación personal al método anterior.

Se estudia la natremia de 240 lactantes con diarrea aguda y deshidratación, en forma simultánea con espectrofotometría y con los test de fragilidad osmótica.

Los resultados obtenidos siguiendo la metodología propuesta por los Drs. Kim y cols. no muestran una adecuada correlación entre la natremia determinada por espectrofotometría y por el test en cuestión.

Esta adecuada correlación se obtiene con la variante al método, propuesta por el autor.

De esta manera, se comprueba un método que permite practicar determinaciones cuantitativas del sodio plasmático, dentro de 3 rangos:

Menos de 120 M Eq. x Lt.

Entre 120-150 M. Eq. x Lt.

Mayor de 150 M. Eq. x Lt.

Este método, además de dar una adecuada seguridad estadística en sus resultados, presenta las cualidades de ser barato, fácil de realizar, que no necesita sino de instrumental básico, rápido y que ocupa escasa cantidad de sangre.

Se recomienda en todos aquellos lugares en los cuales no se cuenta con un espectrofotómetro.

SUMMARY

Using the relationship demonstrated by Drs. Kim, Borges & Holliday (Am. J. Dis. of Child. 104: 281, 1962) which exists between Natremia and the osmotic fragility of the red blood cell, two different methods to determine Plasmatic Sodium were studied: a) the aforesaid method, and b) a personal modification of the method.

240 infants under the age of two years, who came to the hospital because of acute diarrhea with dehydration, were studied simultaneously using spectrophotometry and the methods under observation.

Statistically analysed the method of Drs. Kim et al. shows an inadequate correlation between the results obtained by spectrophotometry and the method under study.

An adequate correlation was obtained while using the author's personal method.

Thus, 3 ranges permit a quantitative determination of plasmatic sodium:

Under 120 mEq x Lt.

Between 120-150 mEq x Lt.

Over 150 mEq x Lt.

This method offers the following advantages:

easy to perform

fast

cheap

only basic equipment is needed

small amounts of blood

useful at any given age of patient except newborn.

This method is recommended in those places in which spectrophotometry is impossible.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.—Dacie J. V. y Lewis S. M. Hematología Práctica. Ediciones Toray, Barcelona, España. 2ª Edición.
- 2.—Danon Y.; Kleinman A. and Danon D. The Osmotic Fragility and Density Distribution of erythrocytes in the Newborn. Acta Haemat. 43: 242; 1970.
- 3.—Darrow D. C. and Yaunet H. The changes in the distribution of body water accompanying increase and decrease in extracellular electrolytes. J. Clin. Invest. 14: 266, 1935.
- 4.—Gowdy J. and Koneman E. W. Erythrocyte Osmotic Fragility adapted to the autoanalyser Amer. J. Clin. Path 47: 682, 1967.
- 5.—Guest G. N. and Yaunet H. Osmometric Behaviour of Normal and Abnormal Human Erythrocyte Blood, 3: 541, 1948.
- 6.—Hellerstein S., Spees W. and Surapathana L. Hemoglobin concentration and Erythrocyte Cation content. J. of Lab. and Clin. Med. 76: 10; 1970.
- 7.—Kim J. Borges W. H. and Holliday M. A. Correlation between R. B. C. Osmotic Fragility and Serum Sodium. Am. J. Dis. of Child. 104: 281; 1962.
- 8.—Kolmer J. A. y Borner F. Métodos de laboratorio Clínico. The University Society N. Y. 3ª Edición, 1943.
- 9.—Maccioni, A. Alteraciones Hidroelectrolíticas en el lactante deshidratado por diarrea aguda. I déficit de Volumen y tipo Osmolar de deshidratación. Rev. Chil. Ped 41: 1001, 1970.
- 11.—Murphy J. R. The influence of pH and Temperature on some Physical properties of normal erythrocyte and erythrocyte from patient with hereditary spherocytosis. J. Lab. Clin. Med. 69: 758, 1967.

- 12.— *Inzatto L. Esan G. J. F. and Ogiemudia S. E.* The Osmotic Fragility of red cells in new borns and infants. *Acta. Haemat.* 43: 248, 1970.
- 13.— *Overman R. R. Etteldorf J. N. Bass A. C. and Horn G. H.* Plasma and Erythrocyte chemistry of the normal infants from birth to two years of age. *Pediatrics* 7: 565, 1951.
- 14.— *Parpart A. K. Lorenz P. B. Parpart E. R. Gregg J. R. and Chase, A. M.* The Osmotic Resistances of human Red Cells. *J. Clin. Invest.* 26: 636, 1947.
- 15.— *Pitacavage J. Borges W. H. and Holliday M. A.* A relations between cell water and serum Sodium. *Am. J. Dis. Of Child.* 104: 276, 1962.
- 16.— *Sjolin S.* The resistances of red cells in vitro; A study of the osmotic properties the mechanical resistances and the storage, behaviour of red cells of fetuses, children and adults. *Acta Pediat.* 43: 1, 1954.
- 17.— *Varavithya W. and Hellerstein S.* Acute symptomatic Hyponatremia. *J. Pediat.* 71: 269: 283, 1967.
- 18.— *Williams T. F. Fordham C. C. Hollander W. and Welt L. G.* A study of the osmotic Behaviour of the Human Erythrocyte. *The J. of Clin. Invest.* 38: 1587-1598, 1959.
- 19.— *Wolman J. J.* Laboratory applications in clinical Pediatrics Mc. Graw - Hill Book Company, 1957.
- 20.— *Wolf A. V.* Aqueous solutions and Body Fluids Harper and Row Publishers. New York, 1966.

Agradecimientos. Se agradece la ayuda de las Srtas. M. I. Sáez y M. I. Garcés, Enfermeras del Servicio de Pediatría, Hosp. Sótero del Río; al Prof. Dr. J. M. Ugarte, Profesor de Bioestadística, U. Católica, y al Laboratorio Sanderson que facilitó las soluciones experimentales.