

Influencia del anticoagulante en la cuantificación de proteínas totales en el líquido peritoneal del caballo (The influence of anticoagulants on the measurement of total protein concentration in horses peritoneal fluid)

José Carlos Estepa-Nieto^{1,C}, Ignacio López-Villalba¹, Rafael Mayer-Valor¹, Mariano Rodríguez-Portillo² y Escolástico Aguilera-Tejero¹

¹Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales. Carretera Madrid-Cádiz km 396-A. 14014 Córdoba. España

²Unidad de Investigación, Hospital Universitario Reina Sofía. Avenida Menéndez Pidal. 14005 Córdoba. España.

^CDepartamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales. Carretera Madrid-Cádiz km 396-A. 14014 Córdoba. España. Tel: +34957218084 Fax: +34957211093. e-mail: pv1esnij@uco.es

RECVET: 2007, Vol. II, Nº 11

Recibido: 15.09.07 / Referencia: 110703_RECvet / Aceptado: 22.00.07 / Publicado: 01.11.07

RECVET® Revista Electrónica de Clínica Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®. Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org> y con RECvet® - <http://www.veterinaria.org/revistas/recvet>

RESUMEN

Motivos de realización del estudio: La determinación de la concentración de proteínas totales del líquido peritoneal mediante refractometría es un elemento importante en el diagnóstico de procesos de cólico, así como de otras afecciones de la cavidad abdominal del caballo. Teóricamente, la utilización de K₃EDTA podría influir en la cuantificación de proteínas totales en líquido peritoneal.

Hipótesis: El empleo de K₃EDTA como anticoagulante de líquido peritoneal puede dar lugar a una sobreestimación de la concentración de proteínas totales.

Metodología: Este estudio se ha realizado en dos fases: En la primera fase se han obtenido muestras de líquido peritoneal de 26 caballos, utilizando tubos sin anticoagulante y tubos con K₃EDTA, para determinar su concentración de proteínas totales mediante refractometría. En la segunda fase se ha estudiado la influencia que ejerce una solución comercial de K₃EDTA, una solución de K₃EDTA elaborada en nuestro laboratorio con agua destilada y una solución de heparina de litio sobre la cuantificación de proteínas totales de líquido peritoneal mediante refractometría y espectrofotometría (biuret).

Resultados:

- Fase I: Los valores de concentración de proteínas totales obtenidos al utilizar K₃EDTA son superiores a los obtenidos sin el empleo de anticoagulante.

- Fase II: Los valores de proteínas totales obtenidos mediante refractometría son superiores cuando se usa la solución comercial de K₃EDTA como anticoagulante. Del mismo modo, el empleo de la solución de K₃EDTA en agua destilada como anticoagulante da lugar a una sobreestimación de la cantidad de proteínas totales cuando la dosis utilizada es alta. Por el contrario, el empleo de heparina de litio no influye en la determinación de la concentración de proteínas totales mediante refractometría. Por otro lado, el empleo de anticoagulante no interfiere en la determinación de la concentración de proteínas totales cuando se lleva a cabo mediante espectrofotometría.

Conclusiones: La utilización de K₃EDTA como anticoagulante puede dar lugar a una sobreestimación del valor de la concentración de proteínas totales presentes en líquido peritoneal del caballo cuando dicha determinación se realiza mediante refractometría.

Relevancia clínica: Para la determinación de la concentración de proteínas totales del líquido peritoneal del caballo mediante refractometría se recomienda la utilización de heparina de litio como anticoagulante.

Palabras clave: caballo | líquido peritoneal | proteínas | cuantificación

SUMMARY

Reasons for performing the study: Refractometric measurement of the total protein (TP) content of peritoneal fluid is an important diagnostic aid in horses with colic and other abdominal diseases. K₃EDTA is routinely used as anticoagulant for peritoneal fluid. Theoretically, K₃EDTA could influence the refractometric measurement of TP in peritoneal fluid.

Hypothesis: The TP content of peritoneal fluid measured by refractometry can be overestimated when using K₃EDTA as anticoagulant.

Methods: The study has been carried out in 2 stages. In experiment 1, the TP concentration of peritoneal fluid was measured by refractometry in 26 peritoneal fluid samples collected in tubes with and without K₃EDTA. In experiment 2, the influence of a commercial solution of K₃EDTA, a solution of K₃EDTA in distilled water and lithium heparin on the refractometric and spectrophotometric (biuret) quantification of TP content in peritoneal fluid samples was assessed.

Results: In experiment 1, TP concentration was consistently higher in samples with K₃EDTA than in samples without anticoagulant. In experiment 2, TP concentration measured by refractometry was overestimated in all samples with commercial K₃EDTA. The solution of K₃EDTA in distilled water only caused TP overestimation at high K₃EDTA concentrations. By contrast, lithium heparin did not influence the refractometric values of TP. Neither anticoagulant modified TP values when measured by the biuret method.

Conclusions: The use of K₃EDTA as anticoagulant may result in a significant overestimation of TP values of peritoneal fluid samples measured by refractometry.

Potential relevance: If the TP concentration of peritoneal fluid is measured by refractometry, samples should be preferably collected using lithium heparin as anticoagulant.

Keywords: horse | peritoneal fluid | protein content | measurement

INTRODUCCIÓN

El análisis de líquido peritoneal es una herramienta esencial en el diagnóstico del cólico equino (Coffman y Garner 1972). Este procedimiento también presenta un enorme interés en el diagnóstico de procesos de peritonitis, ascitis, enfermedades neoplásicas y otras afecciones de la cavidad abdominal del caballo (Bach y Ricketts 1974, Swanwick y Wilkinson 1976, Milne y col., 1990).

El estudio del líquido peritoneal conlleva una valoración visual, mediante la que se lleva a cabo la apreciación del color, turbidez, etc., y un análisis de laboratorio. La determinación de la concentración de proteínas totales y el estudio citológico constituyen los elementos más importantes para su evaluación (Nelson 1979, Brownlow y col., 1981, Garma-Aviña 1998).

Dada la rapidez de actuación que se precisa ante el diagnóstico de los procesos de cólico, la refractometría constituye la técnica más utilizada para la determinación de la concentración de proteínas totales presentes en líquido peritoneal (Coffman 1973). Para ello, se recomienda la colección de líquido peritoneal en tubos con ácido etilén-diamino-tetraacético como anticoagulante, con la finalidad de evitar la formación de coágulos y preservar la morfología de las células existentes en la muestra (Adams y Sojka 1999, Mair 2002).

Existen estudios en los que se ha demostrado que las sales del ácido etilén-diamino-tetraacético dan lugar a una sobreestimación del valor de la concentración de proteínas plasmáticas totales determinado por refractometría en perros y en conejos (Dubin y Hunt 1978). Por otra parte, también se ha puesto de manifiesto que los valores de concentración de proteínas totales de muestras de líquido peritoneal procedentes de potros sanos determinados mediante refractometría son superiores a los obtenidos por la técnica de biuret (Grinden y col., 1990). Además, el empleo de tubos comerciales con EDTA suele incorporar sustancias que evitan su evaporación y que podrían influir al determinar la concentración de proteínas totales por refractometría.

El objetivo del presente trabajo es estudiar la influencia de dos anticoagulantes (K_3 EDTA y heparina de litio) sobre la concentración de proteínas totales presentes en el líquido peritoneal del caballo determinada mediante refractometría y espectrofotometría (biuret).

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental

Este estudio se ha llevado a cabo en dos fases:

Fase I: En esta fase del estudio se ha determinado la concentración de proteínas totales presente en muestras de líquido peritoneal correspondientes a 26 caballos hospitalizados en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Córdoba. A partir de cada muestra se han obtenido dos alícuotas: a) en tubo sin anticoagulante; y b) en tubo con K_3 EDTA (TAPVAL®)^a. La concentración de proteínas totales se ha determinado en ambas alícuotas mediante refractometría.

Fase II: En esta parte del estudio se ha cuantificado la concentración de proteínas totales en muestras (n=50) de concentración proteica conocida. Para la elaboración de dichas muestras se ha utilizado líquido peritoneal procedente de un caballo sano al que se le han añadido diferentes cantidades de suero obtenido a partir del mismo animal, realizando las siguientes diluciones: A) 100% de líquido peritoneal; B) 75% de líquido peritoneal + 25% de suero; C) 50% de líquido peritoneal + 50% de suero; D) 25% de

líquido peritoneal + 75% de suero; y E) 100% de suero. A partir de cada una de estas diluciones se obtuvieron 10 alícuotas, utilizando diferentes dosis de anticoagulante en cada una de ellas: 1ª) muestra sin anticoagulante; 2ª) muestra + solución comercial de K₃EDTA (5 µmol/ml); 3ª) muestra + solución comercial de K₃EDTA (10 µmol/ml); 4ª) muestra + solución comercial de K₃EDTA (20 µmol/ml); 5ª) muestra + solución de K₃EDTA en agua destilada (5 µmol/ml); 6ª) muestra + solución de K₃EDTA en agua destilada (10 µmol/ml); 7ª) muestra + solución de K₃EDTA en agua destilada (20 µmol/ml); 8ª) muestra + heparina de litio (18 UI/ml); 9ª) muestra + heparina de litio (36 UI/ml); y 10ª) muestra + heparina de litio (72 UI/ml). En esta fase se ha determinado la concentración de proteínas totales, tanto por refractometría como por la técnica de biuret, en cada una de las alícuotas.

Anticoagulantes

En este estudio se ha utilizado una solución comercial de K₃EDTA (0,25 M), proporcionada por Aquisel SL (Barcelona, Spain), de igual naturaleza a la que contienen los tubos que incorporan K₃EDTA como anticoagulante (TAPVAL®)^a. También, se ha empleado una solución 0,25 M de K₃EDTA elaborada en nuestro laboratorio mediante disolución de K₃EDTA (Sigma Chemical)^b en agua destilada. Para lograr las diferentes dosis de EDTA (5, 10 y 20 µmol/ml de líquido peritoneal), se han añadido 20, 40 y 80 µl, respectivamente, de las soluciones de K₃EDTA a alícuotas de líquido peritoneal de 1 ml. Por otra parte, se han añadido 30, 60 y 120 µl de una solución acuosa de heparina de litio (600.000 UI/l) a alícuotas de líquido peritoneal de 1 ml para conseguir las distintas dosis de heparina deseadas (18, 36 y 72 UI/ml, respectivamente). Las dosis de anticoagulante recomendadas son 5 µmol de K₃EDTA/ml (20 µl/ml) y 18 UI de heparina de litio/ml (30 µl/ml) (ISO 1995, NCCSL 1996).

Determinación de la concentración de proteínas totales

Para la determinación de la concentración de proteínas totales se ha usado un refractómetro manual (Technic, Model AZJ-D)^c. Todas las determinaciones se han realizado en un laboratorio a temperatura controlada. Este método se muestra fiable para la determinación de proteínas totales en muestras de concentración inferior a 6 g/l (George and O'Neil 2001). Dado que la interpretación de los índices de refractometría puede verse sometida a cierto grado de subjetividad, la lectura de éstos se ha realizado por tres observadores independientes en cada una de las determinaciones. Para la cuantificación de la concentración de proteínas totales mediante la técnica de biuret se ha empleado un kit comercial (BioSystems Reagents & Instruments)^d que utiliza albúmina sérica bovina como estándar para un rango de 5 a 100 g/l. El límite de detección de este ensayo es de 4,6 g/l. Las determinaciones mediante espectrofotometría también se han llevado a cabo para cada muestra por triplicado.

Análisis estadístico

Los valores de concentración de proteínas totales aparecen representados como media ± desviación estándar de la media. Para estudiar el efecto que ejerce cada anticoagulante se ha realizado un análisis de varianza (ANOVA) con una corrección de Bonferroni. La comparación de los valores obtenidos mediante refractometría con los encontrados al utilizar la técnica de biuret se ha efectuado mediante una prueba *t* no pareada. El estudio de correlación entre los valores obtenidos mediante refractometría y los hallados por espectrofotometría se ha llevado a cabo mediante el test de Pearson. Se han considerado estadísticamente significativos aquellos análisis con valor de *p* inferior a 0,05.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la primera fase del estudio ponen de manifiesto que los valores de concentración de proteínas totales presentes en líquido peritoneal obtenidos mediante refractometría son superiores cuando se utiliza K_3EDTA que cuando no se emplea anticoagulante ($40,7 \pm 2,9$ vs. $25,5 \pm 2,4$ g/l; $p < 0,001$). La diferencia de concentración media entre alícuotas con K_3EDTA y alícuotas sin anticoagulante es de 15 ± 1 g/l, llegando a encontrar diferencias de hasta 28 g/l (Figura 1)

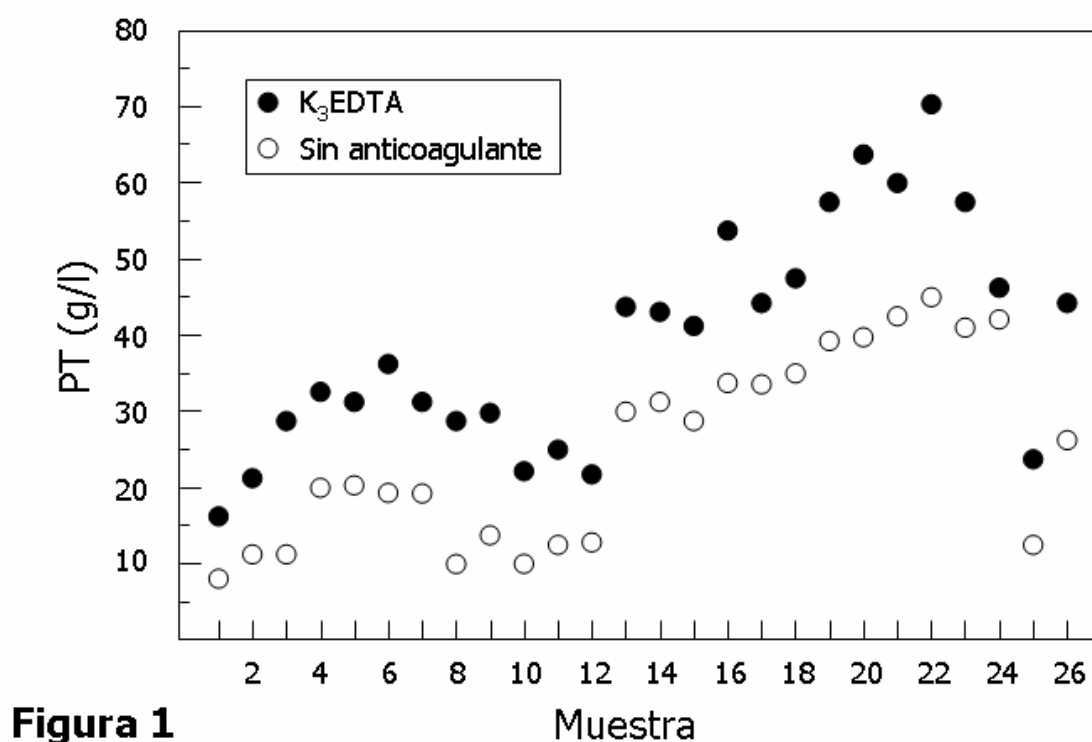


Figura 1. Valores de concentración de proteínas totales (PT) presentes en líquido peritoneal de 26 caballos determinados mediante refractometría. Las muestras se recogieron en tubos con K_3EDTA (●) y en tubos sin anticoagulante (○).

Los valores encontrados en la segunda fase del estudio aparecen reflejados en la Tabla I. En ella se aprecia que no existe diferencia entre los valores de concentración de proteínas totales obtenidos mediante espectrofotometría y los medidos por refractometría en las alícuotas que no contienen anticoagulante, cuando la concentración de proteínas se sitúa entre 25 y 70 g/l. Sin embargo, sí aparecen diferencias entre ambos métodos de medida cuando la concentración de proteínas totales es baja, encontrando en estos casos que al utilizar la técnica de biuret, los valores obtenidos, 12 ± 1 g/l, son superiores, a los determinados con refractometría, 9 ± 1 g/l, $p < 0,05$.

Al cuantificar la concentración de proteínas totales mediante espectrofotometría, utilizando solución comercial de K_3EDTA o solución de K_3EDTA elaborada, los valores obtenidos suelen ser ligeramente inferiores a los encontrados sin la utilización de anticoagulante, existiendo diferencias significativas cuando se utiliza K_3EDTA a dosis

altas. Sin embargo, cuando medimos por refractometría, el empleo de K₃EDTA da lugar a valores superiores a los detectados en muestras sin anticoagulante.

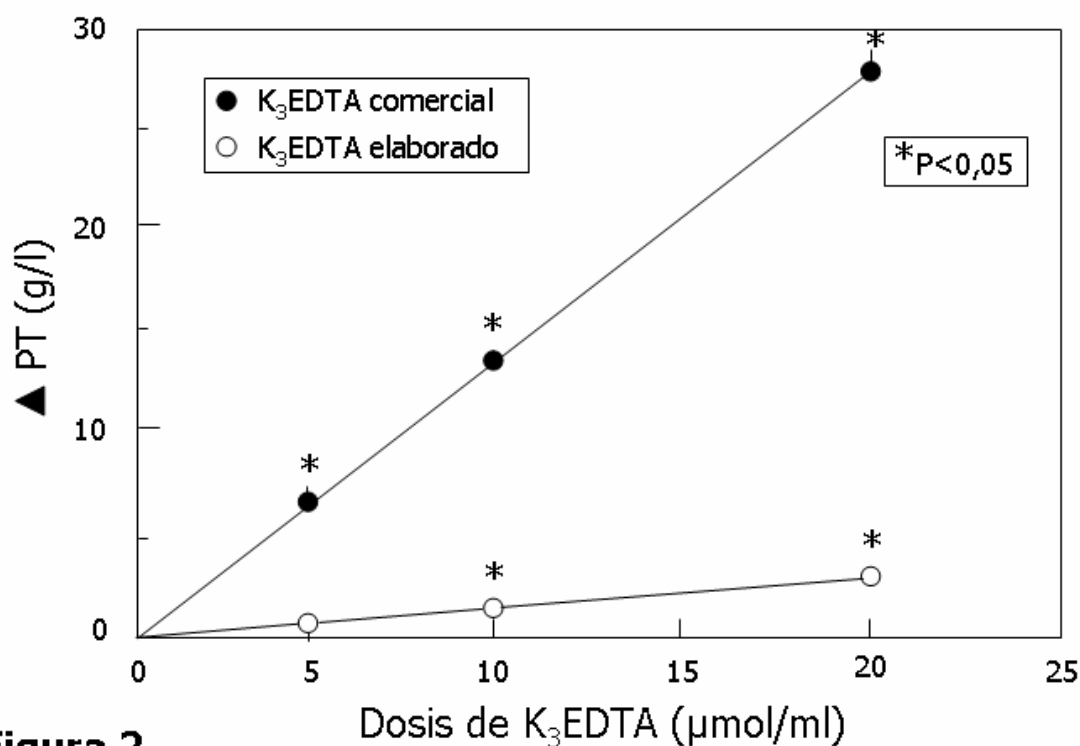


Figura 2

Figura 2. Relación entre la dosis de K₃EDTA añadida a muestras de líquido peritoneal y el grado de sobreestimación encontrado en los valores de concentración de proteínas totales (Δ PT).

Δ PT (g/l) = (PT obtenido con K₃EDTA - PT obtenido sin anticoagulante). * p<0,05 Diferencias estadísticamente significativas respecto a los valores obtenidos sin anticoagulante.

Al utilizar solución comercial de K₃EDTA, los valores obtenidos mediante refractometría son superiores, significativamente, a los encontrados con la técnica de biuret, con las tres dosis de K₃EDTA utilizadas. Sin embargo, la utilización de solución de K₃EDTA elaborada solamente genera valores superiores de concentración de proteínas totales cuando se añade a dosis altas. También cabe destacar que la sobreestimación del valor de la concentración de proteínas totales inducida con el empleo de K₃EDTA resulta más marcada en muestras de baja concentración proteica (Tabla I).

Además, la sobreestimación del valor de la concentración de proteínas totales medido por refractometría, propiciada por la utilización de K₃EDTA, es dependiente de la dosis de anticoagulante utilizada. Como se muestra en la Figura 2, existe una relación lineal entre la dosis de K₃EDTA empleada y la diferencia observada entre los valores de concentración de proteínas obtenidos con y sin anticoagulante. La sobreestimación producida al emplear la dosis de K₃EDTA recomendada (5 μ mol/ml) es de $7,1 \pm 1,6$ g/l para la solución comercial de K₃EDTA y de $0,7 \pm 0,5$ g/l para la solución que utiliza K₃EDTA en agua destilada.

Por lo que se refiere al empleo de heparina de litio como anticoagulante, su utilización a la dosis recomendada (18 UI/ml) no provoca cambios en relación a los valores de proteínas totales observados sin anticoagulante. En cambio, cuando se utiliza a dosis altas, sí que aparece una reducción en los valores observados, siendo más marcada cuando la determinación se efectúa mediante refractometría. De igual forma a como ocurre en muestras sin anticoagulante, el uso de heparina de litio solamente conduce a la aparición de diferencias entre ambos métodos de medida (refractometría y espectrofotometría) cuando la concentración de proteínas totales presente en la muestra es muy baja (Tabla I).

		A	B	C	D	E
Sin anticoagulante	R	9±1†	25±1	40±1	56±2	70±1
	B	12±1	27±1	41±1	56±2	70±2
K ₃ EDTA(1) (5 µmol/ml)	R	17±1*†	31±1*†	46±1*†	63±2*†	79±2*†
	B	12±2	27±1	41±1	55±2	68±2
K ₃ EDTA(1) (10 µmol/ml)	R	22±1*†	40±1*†	54±2*†	70±2*†	86±4*†
	B	11±1	26±2	40±1	53±2	66±2
K ₃ EDTA(1) (20 µmol/ml)	R	39±1*†	53±1*†	68±2*†	84±2*†	96±1*†
	B	11±1	23±1*	37±2*	52±2	64±2*
K ₃ EDTA(2) (5 µmol/ml)	R	9±1	26±1	41±1	56±1	71±1*
	B	11±1	28±1	41±1	51±2	69±1
K ₃ EDTA(2) (10 µmol/ml)	R	10±1*	27±1	41±1	57±1†	71±1*
	B	11±1	27±1	41±1	50±2*	68±1
K ₃ EDTA(2) (20 µmol/ml)	R	13±1*†	30±1*†	42±1*†	57±1†	71±1*†
	B	10±1	25±1	38±1*	48±1*	66±1*
Heparina de litio (18 UI/ml)	R	8±1†	25±1	40±2	55±2	68±2
	B	12±2	27±2	41±1	55±1	67±1
Heparina de litio (36 UI/ml)	R	8±1*†	22±2	37±2*	54±1	68±2
	B	11±1	24±2	40±2	54±2	67±1
Heparina de litio (72 UI/ml)	R	7±1*†	21±2*	35±2*	49±4*	65±3*
	B	11±1	24±3	38±1*	51±1*	62±2*

Tabla I. Valores de concentración de proteínas totales (g/l) determinados en muestras de líquido peritoneal de diferente concentración proteica mediante refractometría (R) y por el método de biuret (B) (A: 100% líquido peritoneal; B: 75% líquido peritoneal + 25% suero; C: 50% líquido peritoneal + 50% suero; D: 25% líquido peritoneal + 75% suero; y E: 100% suero). K₃EDTA(1) = solución comercial de K₃EDTA (Aquisel SL, Barcelona, Spain); K₃EDTA(2) = solución de K₃EDTA elaborada (Sigma Chemical, St Louis MO, USA) * Diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) respecto a muestras de la misma concentración proteica sin anticoagulante.

† Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los valores obtenidos por refractometría y por el método de biuret en muestras con la misma concentración de proteínas y la misma dosis de anticoagulante.

Finalmente, hay que destacar que existe una correlación significativa entre los valores de proteínas totales obtenidos mediante refractometría y espectrofotometría, tanto en muestras sin anticoagulante ($r = 0,999$, $p < 0,001$), muestras en las que se utiliza K_3EDTA ($r = 0,996$, $p < 0,001$) y muestras en las que se emplea heparina de litio ($r = 0,999$, $p < 0,001$).

DISCUSIÓN

El análisis de líquido peritoneal es un procedimiento habitual en medicina interna equina. Aunque la realización de esta técnica resulta muy útil para el diagnóstico de una amplia variedad de procesos que afectan a la cavidad abdominal del caballo, su uso resulta especialmente interesante en el diagnóstico de procesos de cólico. En este sentido, la determinación de la concentración de proteínas totales presentes en líquido peritoneal y la valoración citológica del mismo ofrece gran cantidad de información a la hora de valorar la gravedad del proceso. Además, la información obtenida tras el estudio del líquido peritoneal es a veces crucial de cara al planteamiento de una terapia médica o quirúrgica (Coffman y Garner 1972, Nelson 1979).

Así pues, se precisa una técnica que posibilite conocer la concentración de proteínas totales presentes en líquido peritoneal de una forma rápida, lo que hace que la refractometría se convierta en la técnica más comúnmente utilizada. Por otro lado, además de la rapidez y facilidad de su realización, otra ventaja que ofrece esta técnica es la escasa cantidad de muestra que precisa. En este sentido, la forma de obtención de líquido peritoneal más recomendada es la que emplea tubos que contienen EDTA como anticoagulante (Adams y Sojka 1999, Mair 2002).

Existen estudios en los que se ha demostrado que la utilización de EDTA como anticoagulante, en muestras de plasma de perro y de conejo, provoca un ligero incremento en la concentración de proteínas plasmáticas totales cuando la determinación se realiza por refractometría. Para la explicación de este efecto se han considerado dos mecanismos diferentes: a) fenómeno osmótico de paso de líquido desde los glóbulos rojos hacia el plasma; y, b) incorporación de solutos al compartimento plasmático. Con las sales de EDTA más comúnmente utilizadas (sódica y potásica), estos mecanismos actúan de forma contrapuesta, es decir, el fenómeno osmótico de paso de líquido desde los glóbulos rojos hacia el plasma contrarrestaría el efecto ocasionado por la incorporación de solutos, resultando en un efecto neto despreciable (Dubin y Hunt 1978). Sin embargo, el líquido peritoneal carece teóricamente de glóbulos rojos, por lo que no cabría esperar que existiera paso osmótico de líquido procedente del interior de los eritrocitos. De esta forma, el incremento producido en los valores de concentración de proteínas totales en líquido peritoneal determinados mediante refractometría podría deberse a la adición de solutos (EDTA). Además, dado que las sales líquidas de EDTA tienden a formar cristales y estos cristales son difícilmente solubles en los líquidos orgánicos, algunos fabricantes incorporan aditivos para evitar la evaporación y la cristalización del anticoagulante (frecuente en tubos de polipropileno), lo que también podría contribuir al incremento de los valores de proteínas totales obtenidos por refractometría.

Los resultados obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto que el K_3EDTA provoca un incremento en los valores de concentración de proteínas totales presentes en líquido peritoneal cuando se determinan mediante refractometría. Este efecto es más acusado cuando se utiliza la solución comercial de K_3EDTA que cuando se emplea la solución de K_3EDTA elaborada en nuestro laboratorio, debido probablemente a los aditivos que incorpora la primera para evitar su evaporación. Dado que el tipo de aditivo varía en

función del fabricante de la solución, este efecto podría verse modificado por el tipo de tubo utilizado, siendo más frecuente encontrar estas sustancias en tubos de polipropileno.

Además de estudiar el efecto causado por la dosis de K_3EDTA comúnmente incorporada en los tubos (5 $\mu\text{mol/ml}$), también se ha analizado el efecto que producen dosis dos veces superiores a la recomendada (10 y 20 $\mu\text{mol/ml}$). Al utilizar estas dosis se ha confirmado el efecto ya observado con la dosis recomendada, al mismo tiempo que se ha constatado la existencia de un efecto dependiente de la dosis de K_3EDTA empleada. Por otro lado, la utilización de dosis superiores a las recomendadas ha permitido simular lo que ocurre cuando se colecta líquido peritoneal sin completar el volumen indicado por el fabricante. Es una práctica bastante común en clínica equina el realizar abdominocentesis y obtener escasa cantidad de líquido peritoneal, con lo que la dosis de K_3EDTA presente en el tubo de colección resultaría muy superior a la recomendada. La existencia de este efecto dependiente de la dosis de EDTA utilizada, unido a un llenado inapropiado del tubo, podría explicar el alto grado de sobreestimación encontrado en algunas muestras analizadas mediante refractometría en la primera fase del estudio.

En este trabajo se ha estudiado el efecto del K_3EDTA sobre los valores de concentración de proteínas totales en líquido peritoneal por ser éste el anticoagulante más ampliamente utilizado en clínica equina. Aunque no tenemos constancia de la realización de este tipo de estudios en el caballo, existen numerosos trabajos, realizados sobre plasma de diferentes especies animales, a partir de los cuales se ha sugerido que el efecto que ejerce el Na_2EDTA y el H_4EDTA sobre los valores de concentración plasmática de proteínas totales determinados mediante refractometría podría ser más marcado que el que ejerce el K_3EDTA (Dubin y Hunt 1978).

Por otro lado, también se ha observado que la utilización de heparina de litio como anticoagulante no conlleva la aparición de cambios en la concentración de proteínas totales del líquido peritoneal determinada mediante refractometría. Así pues, ante la necesidad de cuantificar la concentración de proteínas totales en líquido peritoneal será recomendable el uso de heparina de litio en aquellas ocasiones en las que dicha determinación se lleve a cabo mediante refractometría.

La medición de la concentración de proteínas totales en líquido peritoneal mediante la técnica de biuret no suele verse afectada por el anticoagulante empleado. No obstante, es importante considerar que al utilizar altas dosis de anticoagulante (K_3EDTA y heparina de litio) se produce una ligera infraestimación en la concentración de proteínas totales al utilizar este método. Esta diferencia podría explicarse por el efecto de dilución que ejercería el volumen de anticoagulante añadido.

En general, existe muy buena correspondencia entre los valores de refractometría y espectrofotometría obtenidos sin anticoagulante, con K_3EDTA y con heparina de litio, como se demuestra mediante el estudio de correlación realizado, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre las determinaciones llevadas a cabo por ambos métodos en muestras de baja concentración de proteínas totales. Esta disparidad podría estar influenciada por el hecho de que la concentración de proteínas totales presente en algunas de las muestras estudiadas se sitúa próxima al límite de sensibilidad de las técnicas de medida (5-6 g/l) (George y O'Neil 2001, Braun y col., 2001).

Por lo tanto, se puede concluir que:

a) La utilización de K_3EDTA como anticoagulante puede inducir a una sobreestimación de la concentración de proteínas totales presente en muestras de líquido peritoneal de caballos cuando se cuantifica mediante refractometría. Esta sobreestimación, susceptible de variar en función del tipo de solución de K_3EDTA empleada, es más marcada cuando la

dosis de K₃EDTA utilizada es superior a la recomendada (e.g. cuando el tubo de colección no se completa hasta el nivel recomendado).

b) El empleo de heparina de litio como anticoagulante no influye sobre la concentración de proteínas totales del líquido peritoneal determinada por refractometría.

c) El anticoagulante utilizado (K₃EDTA y heparina de litio, a la dosis recomendada) no influye sobre la concentración de proteínas totales del líquido peritoneal cuando la determinación se lleva a cabo con la técnica de biuret.

A partir de estos datos, se deduce que para la cuantificación de los niveles de proteínas totales presentes en muestras de líquido peritoneal de caballos mediante refractometría es recomendable emplear tubos sin anticoagulante o utilizar heparina de litio como anticoagulante. Del mismo modo, es muy importante rellenar el tubo de colección de líquido, siguiendo estrictamente las indicaciones del fabricante.

Agradecimientos: Los autores de este trabajo muestran su agradecimiento a Aquisel SL por proporcionar los anticoagulantes utilizados para la realización del estudio y al Dr. Eduardo Catalán por su asistencia técnica.

Fuente de Financiación: La realización de este trabajo ha sido financiada por el Plan Andaluz de Investigación (Grupo CTS-179).

RELACIÓN DE FABRICANTES

^a Aquisel SL, Barcelona, Spain.

^b Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA.

^c Auxilab SL, Beriain, Navarra, Spain.

^d BioSystems Reagents & Instruments, Barcelona, Spain.

- Este trabajo ha sido traducido a partir del artículo titulado "The influence of anticoagulants on the measurement of total protein concentration in equine peritoneal fluid", llevado a cabo por los autores "Estepa JC, Lopez I, Mayer-Valor R, Rodriguez M, y Aguilera-Tejero", y publicado en la revista *Res Vet Sci.* 2006 Feb;80(1):5-10, con permiso de Elsevier -.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adams, S.B. and Sojka, J.E., 1999. Abdominocentesis. En: Colahan, P.T, Mayhew, I.G., Merrit, A.M. and Moore, J.N. (eds). *Equine Medicine and Surgery*. Quinta edición. Mosby. St Louis. (USA). pp. 586-589.
2. Bach, L.G. and Ricketts, S.W., 1974. Paracentesis as an aid to the diagnosis of abdominal disease in the horse. *Equine Vet. J.*, 6, 116-121.
3. Braun, J.P., Guelfi, J.F. and Pagês, J.P., 2001. Comparison of four methods for determination of total protein concentrations in pleural and peritoneal fluid from dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 62, 294-296.
4. Brownlow, M.A., Hutchins, D.R. and Johnston, K.G., 1981. Reference values for equine peritoneal fluid. *Equine Vet. J.*, 13, 127-130.
5. Coffman, J.R. and Garner, H.E., 1972. Acute abdominal diseases in the horse. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 161,1195-1198.
6. Coffman, J.R., 1973., 1973. Technique and interpretation of abdominal paracentesis. *Mod. Vet. Pract.*, 54, 79-81.
7. Dubin, S. and Hunt, P., 1978. Effect of anticoagulants and glucose on refractometric estimation of protein in canine and rabbit plasma. *Lab. Anim. Sci.*, 28, 541-544.
8. Garma-Aviña, A., 1998. Cytology of 100 samples of abdominal fluid from 100 horses with abdominal disease. *Equine Vet. J.*, 30, 435-444.

9. George, J.W. and O'Neill, S.L., 2001. Comparison of refractometer and biuret methods for total protein measurement in body cavity fluids. *Vet. Clin. Pathol.*, 30, 16-18.
10. Grindem, C.B., Fairley, N.M., Uhlinger, C.A. and Crane, S.A., 1990. Peritoneal fluid values from healthy foals. *Equine Vet. J.*, 22, 359-361.
11. ISO: International Organization for Standardization. Single use containers for venous blood specimen collection. ISO 6710:1995(F) Geneva, Switzerland, 1995.
12. Mair, T., 2002. Abdominocentesis (abdominal paracentesis). En: Mair, T., Divers, T. and Ducharme, N. (eds). *Manual of Equine Gastroenterology*. WB Saunders Co. London. (UK). pp. 13-20.
13. Milne, E.M., Doxey, D.L. and Gilmour, J.S., 1990. Analysis of peritoneal fluid as a diagnostic aid in grass sickness (equine disautonomia). *Vet. Rec.*, 127, 162-165.
14. NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evacuated tubes and additives for blood specimen collection - 4th ed., approved standard. NCCLS Document H1-A4. Pennsylvania, USA, 1996.
15. Nelson, A.W., 1979. Analysis of equine peritoneal fluid. *Vet. Clin. N. Am.: Large Anim. Pract.*, 1, 267-274.
16. Swanwick, R.A. and Wilkinson, J.S., 1976. A clinical evaluation of abdominal paracentesis in the horse. *Aust. Vet. J.*, 52, 109-116.

RECVET® Revista Electrónica de Clínica Veterinaria está editada por **Veterinaria. Organización®**. Es una revista científica, arbitrada, online, mensual y con acceso completo a los artículos íntegros. Publica preferentemente trabajos de investigación originales referentes a la **Medicina y Cirugía Veterinaria** desde el aspecto Clínico en cualquier especie animal. Se puede acceder vía web a través del portal **Veterinaria.org®** <http://www.veterinaria.org> o desde **RECVET®** <http://www.veterinaria.org/revistas/recvet> Dispones de la posibilidad de recibir el Sumario de cada número por **correo electrónico** solicitándolo a recvet@veterinaria.org Si deseas postular tu artículo para ser publicado en **RECVET®** contacta con recvet@veterinaria.org después de leer las Normas de Publicación en <http://www.veterinaria.org/revistas/recvet/normas.html>

Se autoriza la difusión y reenvío de esta publicación electrónica siempre que se cite la fuente, enlace con **Veterinaria.org®** <http://www.veterinaria.org> y **RECVET®** <http://www.veterinaria.org/revistas/recvet>

Veterinaria Organización S.L.® (Copyright) 1996-2007 Email: info@veterinaria.org