

Sensor óptico para la detección de sangramientos ocultos en superficies inanimadas y fluidos corporales como diagnóstico precoz y tratamiento oportuno de enfermedades gástricas y renales de importancia médica. 2015

A inscribir en CNR.

*Dr. Antonio Vásquez Hidalgo, Ph.D **

RESUMEN. Detectar sangramientos ocultos en orina, heces y superficies inanimadas para prevenir enfermedades gástricas y renales. De las superficies inanimadas por medio de un hisopo o palillo de madera se toma una muestra mínima de menos de un micro litro de sangre y se lleva a un circuito integrado elaborado y adaptado con piezas electrónicas que se encuentran en plaza, se crea un sensor con capacidad de detectar pequeñas cantidades de sangre similares a una gota o menores que una gota de sangre. Se agrega anticoagulante y se procede a centrifugar la orina sospechosa 10 ml a 2500 rpm x 10 minutos, Se decanta el sobrenadante dejando un ml o medio en el tubo de ensayo para re suspender el sedimento. Se toma una alícuota de 1 ml y se coloca muestra en el aparato óptico. En su procedimiento se utiliza un reactivo para lisar los glóbulos rojos con peróxido 5 % y liberar la hemoglobina. Si hay gas más luz se activará el sensor y se visualizará una luz roja por liberación de un fotón de luz indicando prueba positiva. Se procede a tomar con un palillo de madera una porción pequeña de heces 20 g luego en solución salina fisiológica e ir deshaciendo las heces en el diluyente con ayuda de una varilla de vidrio, hasta conseguir una suspensión fina y homogénea. Se agrega anticoagulante y se procede a centrifugar la muestra sospechosa 10 ml a 2500 rpm x 10 minutos, Se decanta el sobrenadante dejando un ml o medio en el tubo de ensayo para re suspender el sedimento. Se toma una alícuota de 1 ml y se coloca muestra en el aparato óptico. En las pruebas realizadas, el sensor es capaz de detectar pequeñas cantidades de sangramientos con una sensibilidad del 90 %. A concentraciones de 0.05 a 1 microlitro.

Palabras clave: sangramientos ocultos, sensibilidad y especificidad.

INTRODUCCION.

El estudio de sangramientos ocultos, cuya entidad clínica es causada desde cáncer gástrico e intestinal hasta casos de sangramiento de tubo digestivo inferior ha aumentado, debido a que son imperceptibles por el paciente.

Los casos no son tratados oportunamente con la consiguiente alta tasa de mortalidad en los indicadores de salud. Hay pacientes con pérdida de sangre por vía gastroduodenal menor de 100 ml por día y las heces lucen normales, sin sospechar que exista un sangrado oculto. O existir en otros

casos hematuria microscópica sin ser detectado el sangramiento.

Por lo que el uso de técnicas para detectar sangramientos ocultos es muy utilizado en las áreas de ciencias de la salud y área de Medicina Forense, de tal manera que su práctica es usada en el caso de superficies inanimadas detectar sangramientos difíciles de detectar a simple vista por medio de la luminiscencia, utilizando lo que se denomina "luminol" cuyo principio de la prueba se basa en la liberación de un fotón para emitir luz. En medicina se han popularizado el guayacol y otros como medios para detectar sangramientos ocultos en heces y orina.

La luminiscencia su principio fundamental es la emisión de luz en la oscuridad, sin utilizar calor, siempre y cuando exista sangre

para que active su reacción química como catalizador. Si la energía de excitación proviene de una reacción química se le denomina quimioluminiscencia.

La sangre humana, tiene la característica fundamental que tiene hierro, al ser oxidado permite emisión de luz al contacto con un reactivo químico para excitar sus componentes sirve como catalizador para acelerar las reacciones químicas, para liberar el grupo hem se necesita un componente denominado peróxido, que hace lizar el glóbulo rojo y permite la liberación de gas mas agua junto al hierro presente en la sangre.

Existen actualmente métodos inmunológicos con alta sensibilidad, basados en reacciones de aglutinación en muchos de ellos, pero son costosos y de difícil adquisición.

Hay que recordar que como médicos, que en un paciente si encontramos una disminución del hematocrito y diagnosticamos una anemia ferropénica, hay que sospechar que existe de base un sangrado gastrointestinal oculto. O si sospechamos problema renal de base como infecciones en vejiga, riñón, próstata, cáncer o quistes entre otros puede haber un sangramiento oculto subyacente. O problema gastrointestinal de base como pólipos, cáncer, úlceras entre otros.

OBJETIVOS

GENERAL: Detectar sangramientos ocultos en orina, heces y superficies inanimadas para prevenir enfermedades agudas y crónicas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Determinar sangramientos ocultos utilizando un sensor óptico.
2. Procesar muestras de superficies inanimadas, orina y heces para encontrar sangramientos ocultos.

MATERIAL Y METODOS

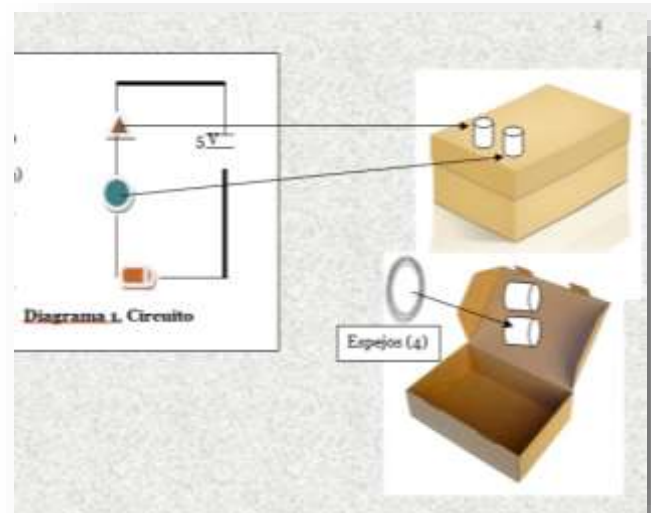


Diagrama:

Diagrama 1. Sensor Óptico.

(El sensor óptico está inscrito en proceso de patente en el CENTRO NACIONAL DE REGISTROS. 2014.)

Desarrollo.

Se crea un sensor con capacidad de detectar pequeñas cantidades de sangre similares a una gota o

menores que una gota de sangre. En su procedimiento se utiliza un reactivo como peróxido de hidrogeno al 5 % para lisar los glóbulos rojos y liberar la hemoglobina. Si hay gas más luz se activará el sensor y se visualizará una luz roja indicando prueba positiva.

El principio fundamental es la oxidación por medio de agua oxigenada y sangre porque la hemoglobina que contiene actúa como catalizador, permitiendo la emisión de fotón de luz momentánea, el aparato detecta esos pequeños cambios de luminosidad y hace activar el sensor, por lo que se enciende el foco led, resultando prueba positiva.

RESULTADOS Y DISCUSION

A. Sensor óptico

Se utiliza como revelador. Carbonato de Sodio, Perborato de

Sodio Trihidratado, (5-amino-2,3-dihydrophthalazine 1,4-dione).

Del sensor óptico aplicado a superficies inanimadas con partículas de sangre detecta entre 0.001 a 0.010 microlitros, en algunos con mayor intensidad de luz que otros según concentración es directamente proporcional.

Lo importante de la prueba es que pocas emisiones de luz, el sensor es capaz de detectar las pruebas.

Tabla I. de contingencia 2x2. Prueba en superficies inanimadas. Método de comparación entre el standard (fenolftaleína) y Prueba evaluada (sensor óptico).

Prueba evaluada	Prueba Gold standard		TOTAL
	+	-	
+	45	8	50
-	5	42	50
TOTAL	50	50	100

Se procede a tomar una alícuota con hisopo impregnado de solución salina en la superficie inanimada y se coloca muestra en sensor óptico.

Si la prueba es positiva en superficies inanimadas, la probabilidad de detectar sangramientos ocultos es del 90 % y la probabilidad de detectar no sangramientos es del 84 %.

En el control se utilizó el fundamento del test fenolftaleína, que se basa en un cambio de pH, la sangre es catalizador y en presencia de peróxido más fenolftaleína se vuelve color rosado en presencia de grupo hem de la sangre.

A. Prueba en Orina.

Tabla II. Método de comparación entre el standard (tira reactiva) y la prueba evaluada.

Prueba evaluada	Prueba Gold standard		TOTAL
	+	-	
+	19	6	25
-	5	20	25
TOTAL	24	26	50

Se agrega anticoagulante y se procede a centrifugar la orina

sospechosa 10 ml a 2500 rpm x 10 minutos, Se decanta el sobrenadante dejando un ml o medio en el tubo de ensayo para re suspender el sedimento. Se toma una alícuota de 1 ml con pipeta pasteur y se coloca muestra en el aparato óptico. O se puede examinar al microscopio a 100x agregando 1 gota de colorante azul de toluidina.

Si la prueba es positiva en orina, la probabilidad de detectar sangramientos ocultos es del 79 % y la probabilidad de detectar no sangramientos ocultos es del 76 %.

En el control se utilizó el Fundamento de la tira reactiva de Comburt test, que se basa en la lectura de orina en el grupo de hb en que se marca de 1 a 4 cruces o de 10 a 250 eritrocitos/micr^l a un cambio de color amarillo a verde.

B. Prueba en Heces.

Tabla IV. Método de comparación entre el standard (Test de guayaco) y Prueba evaluada.

Prueba evaluada	Prueba Gold standard		TOTAL
	+	-	
+	24	1	25
-	5	20	25
TOTAL	29	21	50

Se previene al paciente no ingiere antes de tres días carnes rojas, o tratamiento con hierro, bismuto para evitar falsos positivos.

Se procede a tomar con un palillo de madera una porción pequeña de heces 20 g luego en solución salina fisiológica e ir deshaciendo las heces en el diluyente con ayuda de una varilla de vidrio, hasta conseguir una suspensión fina y homogénea.

Se agrega anticoagulante y se procede a centrifugar la muestra sospechosa 10 ml a 2500 rpm x 10 minutos, Se decanta el sobrenadante dejando un ml o medio en el tubo de ensayo para re

suspender el sedimento.

Se toma una alícuota de 1 ml y se coloca muestra en el aparato óptico.

Se procede a tomar de la muestra de heces una alícuota de 1 ml con pipeta pasteur y luego se coloca muestra en aparato óptico.

Si la prueba es positiva en heces, la probabilidad de detectar sangramientos ocultos es del 82 % y la probabilidad de detectar no sangramientos es del 95 %.

En el control se utilizó el fundamento: Test de guayaco que se basa en la actividad peroxidasa de la hemoglobina, los cuales oxidan catalíticamente sustratos tales como el guayaco y la bencidina en presencia de H₂O₂. En este caso el sustrato oxidable es la tetrametil bencidina, que al ser oxidada vira al color azul verdoso.

O se puede utilizar Hidróxido de sodio 1 ml al 0,25 N (1%). Si cambia

de color amarillo o marrón es prueba positiva.

En el grafico 1 se observa que el sensor es capaz de detectar partículas de sangre con una sensibilidad alta del 90 % en comparación de las pruebas de



FOTO 1. Sensor óptico positiva a sangramiento oculto.

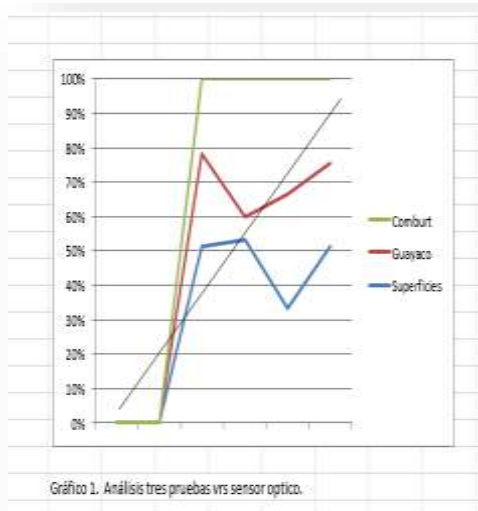


Gráfico 1. Análisis tres pruebas vs sensor optico.

superficies, orina y heces.



FOTO 2. Muestra en superficies inanimadas positiva a sangramiento oculto



FOTO 3. . Muestra de orina positiva a sangramiento oculto





FOTO 4. Palillo de madera con muestra de sangre 0.05 Microl.

CONCLUSIONES

En las pruebas realizadas, el sensor es capaz de detectar pequeñas cantidades de sangramientos con una sensibilidad del 90 %. A concentraciones de 0.05 , 1 microlitro.

BIBLIOGRAFIA

1. Fernández, J. L.; Gallegos, Marta; Brochero, Adriana et al. *Pesquisa del cáncer colorrectal con una prueba inmunológica para sangre oculta en materia fecal. A. Ge. La. 1999.*
2. Mandel, Jack S.; Bond, John; Church, Timothy; et al. *Reducing Mortality from Colorectal Cancer By Screening For Fecal Occult Blood. The New England Journal of Medicine, Vol.328, Nº 19:1365-1371,1993.*

3.- Castelló A, Verdú F. A, "Critical review of presumptive tests for blood stains". *Forensic Sci Communications* 1999.

4.- Castelló A, Alvarez M, Miquel M, Verdú F. *Revelado de manchas latentes: efectividad del luminol y evaluación de su efecto sobre el estudio del DNA. Cuadernos de Medicina Forense* 2002.

5. Cox M. *A Study of the sensitivity and specificity of four presumptive test for blood. J Forensic Sci* 1991.

6.- Gross A M et al. *The effect of Luminol on presumptive tests and DNA analysis using the polymerase chain reaction. J Forensic Sci* 1999.

7. *Manual de instrucciones Combur test. Edición 08-2008. Roche Diagnostics.2008*

8. Squires RH, Jr. *Gastrointestinal Hemorraghe. Pediatr Rev (ed. española)* 1999.

9. Novo, M. et al. *Hemorragia digestiva alta en el niño. Gastroenterología. Pp 118-124. Sin fecha. Internet.*

10. Blanke CD, Faigel DO. *Neoplasms of the small and large intestine. In: Goldman L, Schafer AI, eds. Cecil Medicine. 24th ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; 2011:chap 199.*

11. Mandel, Jack S.; Bond, John; Church, Timothy; et al. *Reducing Mortality from Colorectal Cancer By Screening For Fecal Occult Blood. The New England Journal of Medicine, Vol.328, Nº 19:1365-1371,1993*