

Metodologia per a la presa de mostra i l'anàlisi del lactat sanguini en la medicina de l'esport

Metodología para la toma de muestra y análisis del lactato sanguíneo en la medicina del deporte

M. Banquells Aparicio (diplomada en enfermería)

Departament de Fisiologia i Valoració Funcional. Centre d'Alt Rendiment (San Cugat del Vallès)

RESUM

Aquest article té per objecte donar a conèixer la metodologia utilitzada en el nostre centre per realitzar la presa de mostra i anàlisi del lactat sanguini. Es tracta de descriure tots els passos que cal efectuar per a l'obtenció d'una mostra de sang capil·lar arterialitzada (20 mcl.), així com també la seva anàlisi posterior a través de la tècnica fotoenzimàtica (Boehringer Mannheim), especificant el procediment, el material, el control de qualitat, els reactius, l'anàlisi de la mostra i les precaucions a seguir per obtenir un resultat correcte.

RESUMEN

El objeto del presente artículo es el de dar a conocer la metodología empleada en nuestro centro para realizar la toma de muestra y análisis del lactato sanguíneo. Se trata de describir todos los pasos a efectuar para la obtención de una muestra de sangre capilar arterializada (20 mcl), así como su posterior análisis mediante técnica fotoenzimática (Boehringer Mannheim), especificando el procedimiento, material, control de calidad, reactivos, análisis de la muestra y precauciones a seguir para obtener un correcto resultado.

Introducció

Actualment a quasi tots els laboratoris de fisiologia i valoració funcional esportiva, l'ús de la determinació del lactat sanguini és una pràctica habitual. La utilització del micròmetre com a tècnica d'extracció (lòbul de l'orella o cap del dit) i anàlisi facilita el treball amb esportistes, tant al laboratori com en els tests de camp, cada dia més utilitzats pels entrenadors i metges de l'esport com a control i seguiment de l'entrenament.

Pel fet de ser un micromètode és una tècnica molt sensible i necessitarà gran rigor en la seva utilització i maneig.

L'objectiu d'aquest treball és el d'exposar la metodologia emprada per a la presa de mostra i l'anàlisi del lactat sanguini al nostre laboratori.

Introducción

Hoy en día en casi todos los laboratorios de fisiología y valoración funcional deportiva, el empleo de la determinación del lactato sanguíneo es una práctica habitual. La utilización del micrométodo como técnica de extracción (lóbulo de la oreja o yema del dedo) y análisis facilita el trabajo con deportistas tanto en el laboratorio como en los tests de campo, cada día más utilizados por los entrenadores y médicos del deporte como control y seguimiento del entrenamiento.

Por tratarse de un micrométodo es una técnica muy sensible y precisará de una gran rigurosidad en su empleo y manejo.

El objetivo de este trabajo es el de exponer la metodología empleada para la toma de muestra y el análisis del lactato sanguíneo en nuestro laboratorio.

Material per a la presa de mostra i anàlisi del lactat sanguini

Material per a la presa de mostra

Gassa o cotó, antisèptic desinfectant (alcohol), llancetes desestimables, capil·lars calibrats a 20 mcl d'un sol ús, microcubetes Eppendorf d'1.5 ml, àcid perclòric 0.33 mol.l⁻¹ (Boehringer Mannheim ref. 125369).

Si la presa de mostra es realitza al camp serà necessària una nevera portàtil.

Material per a l'anàlisi

- Fotòmetre 4020 (Hitachi/Boehringer Mannheim, Tokyo, Japan), amb filtre de longitud d'ona de 340 nm. Consta d'un llum, un monocromador i un detector. Converteix l'absorbància de la mostra en senyals electrònics que es processen per microcomputador.

Per a la instal·lació de fotòmetre tindrem en compte que: no ha d'estar exposat a la llum solar directa ni a corrents d'aire de nevera, estarà en un lloc sense pols i ben ventilat, amb absència de vibracions, fluctuacions mínimes de corrent elèctric i lluny d'aparells que produeixin alta freqüència.¹

- Pipetes semiautomàtiques de punta desestimable; n'hem de tenir quatre amb volum fix de 20, 25, 200 i 500 mcl.
- Microcubetes Eppendorf d'1.5 ml per a l'anàlisi.
- Reactius Test-Combination lactat per a la Medicina Esportiva (Boehringer Mannheim, ref. 1178750), conté també, NAD, GPT i LDH.
- Àcid perclòric 0.33 mol.l⁻¹ (Boehringer Mannheim, ref. 125369).
- Aigua bidestil·lada per a la preparació del reactiu.

Material para la toma de muestra y análisis del lactato sanguíneo

Material toma de muestra

Gasa o algodón, antiséptico desinfectante (alcohol), lancetas desechables, capilares calibrados a 20 mcl de un solo uso, microcubetas Eppendorf de 1.5 ml, ácido Perclórico 0.33 mol.l⁻¹ (Boehringer Mannheim ref. 125369).

Si la toma de muestra se realiza en el campo se precisará una nevera portátil.

Material análisis

- Fotómetro 4020 (Hitachi/Boehringer Mannheim, Tokyo, Japan), con filtro de longitud de onda de 340 nm. Consta de una lámpara, un monocromador y un detector. Convierte la absorbancia de la muestra en señales electrónicas que se procesan por microcomputador.

Para la instalación del fotómetro tendremos en cuenta que: no debe estar expuesto a la luz solar directa, ni a corrientes de aire de nevera, estará en un lugar sin polvo y bien ventilado, con ausencia de vibraciones, fluctuaciones de corriente eléctrica mínimas y lejos de aparatos que produzcan alta frecuencia.¹

- Pipetas semiautomáticas de punta desechable, dispondremos de cuatro con volumen fijo de 20, 25, 200 y 500 mcl.
- Microcubetas Eppendorf de 1,5 ml para el análisis.
- Reactivos Test-Combination lactato para la Medicina Deportiva (Boehringer Mannheim, ref. 1178750), contiene tampón, NAD, GPT y LDH.
- Ácido perclórico 0.33 mol.l⁻¹ (Boehringer Mannheim, ref. 125369).
- Agua destilada para la preparación del reactivo.

Exemples de la preparació de les dilucions

Dilucions mmol.l ⁻¹	L-lactat estàndard 1.0 mol.l ⁻¹	Ac. perclòric 0.33 mol.l ⁻¹
4.97	0.025 ml.	5.025 ml.
9.90	0.050 ml.	5.050 ml.
14.77	0.075 ml.	5.075 ml.
19.60	0.100 ml.	5.100 ml.

Taula 1
Tabla 1

Material per al control de qualitat

Precinorm S (Boehringer Mannheim, ref. 125130).
Mostres patró de l-lactat entre 2.39 i 24.40 mmol.l⁻¹.

La preparació de les mostres patró es farà mitjançant una dilució de l-lactat estàndard d'1.0 mol.l⁻¹ (Boehringer Mannheim, ref. 125440 i àcid perclòric 0.33 mol.l⁻¹ (Taula 1).

Metologia de la presa de mostra

Descripció

Essent un micromètode es tracta de l'obtenció d'una petita mostra de sang capil·lar arterialitzada del lòbul de l'orella o del cap del dit.^{2,3}

Metodologia

Eliminar qualsevol rastre de suor de la zona de l'extracció (la suor és rica en lactat). La millor manera és fregar bé la zona amb un cotó o gassa mullada amb aigua i després eixugar-la perfectament. Per aquesta operació es recomana no utilitzar alcohol, ja que el lactat és soluble en aigua, però no en alcohol.

Farem un massatge a la zona de la punció. Es pot utilitzar alguna pomada del tipus Finalgon per vasodilatar la zona quan les condicions ambientals així ho requereixin (fred...), però en la majoria dels casos no acostuma a ser necessari. Desinfectarem amb un antisèptic, com l'alcohol, i efectuarem la punció al lòbul de l'orella o al cap del dit (recomanem el lòbul de l'orella perquè és una zona menys sensible al dolor).

Procurarem que la gota de sang surti espontàniament o pressionarem lleugerament.

Recollirem la sang el més ràpidament possible mitjançant un capil·lar calibrat a 20 mcl sense absorbir aire perquè la mesura sigui exacta.

Material control de calidad

Precinorm S (Boehringer Mannheim, ref. 125130).
Muestras patrón de l-lactato entre 2.39 y 24.40 mmol.l⁻¹.

La preparación de las muestras patrón se efectuará mediante dilución de l-lactato estándar de 1.0 mol.l⁻¹ (Boehringer Mannheim ref. 125440) y ácido perclórico 0.33 mol.l⁻¹ (Tabla 1).

Metodología de la toma de muestra

Descripción

Por ser un micrométodo se trata de la obtención de una pequeña muestra de sangre capilar arterializada del lóbulo de la oreja o la yema del dedo.^{2,3}

Metodología

Eliminar cualquier resto de sudor de la zona de la extracción (el sudor es rico en lactato). La mejor forma es frotar bien la zona con un algodón o gasa mojado en agua y después secar perfectamente. Para esta operación se recomienda no utilizar alcohol, por ser el lactato soluble en agua, pero no en alcohol.

Realizaremos un masaje en la zona de la puncción. Se puede utilizar alguna pomada tipo Finalgon para vasodilatar la zona cuando las condiciones ambientales así lo requieran (frío...), pero en la mayoría de los casos no suele ser necesario. Desinfectaremos con un antiséptico tipo alcohol y efectuaremos la puncción en el lóbulo de la oreja o en la yema del dedo (recomendamos el lóbulo de la oreja por ser una zona menos sensible al dolor).

Procuraremos que la gota de sangre salga espontáneamente o bien presionando levemente.

Recogeremos la sangre lo más rápidamente posible por medio de un capilar calibrado a 20 mcl sin absorber aire para que la medida sea exacta.

Preparació de la mostra

Solució de desproteïnitació (refredada) (Ac. perclòric)	20 mcl.
Sang	20 mcl.

Barrejar bé i centrifugar 2 min. a 12.000 rpm
Separar el sobrenedant

Traurem l'extrem del capil·lar amb una gassa i ajustarem el volum. En efectuar aquesta operació el capil·lar estarà en posició horitzontal.

Una vegada obtinguda la mostra la introduïrem immediatament en un flascó amb 200 mcl d'àcid perclòric 0.33 mol.l⁻¹ (fred) per a la seva desproteïnitació (Taula 2).

La mostra ha d'estar ben barrejada assegurant-nos que no quedin restes de sang en el capil·lar, esbandint-lo amb l'àcid perclòric.

A continuació centrifugarem la mostra, com abans millor, durant dos minuts a 12.000 rpm com a mínim (no s'ha establert el termini en el qual es deteriora la mostra sense contrifugar) i separarem el sobrenedant.

Estabilitat de la mostra

Si volem conservar la mostra, l'estabilitat del sobrenedant separat serà de 8 dies a +4°C i 4 setmanes a 20°C.

Metodologia de l'anàlisi

Descripció del mètode

Mètode Fotoenzimàtic, basat en la determinació fotomètrica de l'increment del NADH en la reacció enzimàtica lactatopiruvat mitjançant LDH, GPT i NAD.^{4,5}

Fonament del tes

I-lactat + NDA+LDH piruvat + NADH + H⁺
Piruvat + l-glutamatoGPT l-alanina + α-cetoglutarat

Comprovacions rutinàries

Abans d'analitzar les mostres ens hem d'assegurar del bon funcionament del fotòmetre. Per fer-ho, rentarem la cubeta amb solució de neteja, calibrarem el volum d'aspiració amb 5.000 mcl de aigua bidestil·lada i revisarem la posició dels llums i dels corrents fotoelèctrics.¹

Un cop efectuades aquestes operacions passarem a l'anàlisi.

Com preparar el reactiu

La preparació del reactiu s'efectua tal com indiquen les instruccions del Test-Combination lactat per a la Medicina Esportiva (Boehringer Mannheim ref. 1178750).

Introduïrem 30 ml d'aigua bidestil·lada amb la solució tampó i dissoldrem bé el NAD, GPT i LDH amb aquesta solució.

L'estabilitat del reactiu serà de 8 hores a +15 - +25°C i de dos dies a +2 - 8°C.

Sacaremos el extremo del capilar con una gasa y ajustaremos el volumen. Al efectuar esta operación el capilar estará en posición horizontal.

Una vez obtenida la muestra la introduciremos inmediatamente en un frasco con 200 mcl de ácido perclórico 0.33 mol.l⁻¹ (frío) para su desproteïnización (Tabla 2).

La muestra debe estar bien mezclada asegurándonos de que no queden restos de sangre en el capilar, enjuagándolo con el ac. perclórico.

A continuación centrifugaremos la muestra lo antes posible durante dos minutos a 12.000 r p m como mínimo (no está determinado el plazo en que se deteriora la muestra sin centrifugar) y separaremos el sobrenadante.

Estabilidad de la muestra

Si deseamos conservar la muestra, la estabilidad del sobrenadante separado será de 8 días a +4°C y 4 semanas a 20°C.

Metodología del análisis

Descripción de método

Método Fotoenzimático, basado en la determinación fotométrica del incremento del NADH en la reacción enzimática lactatopiruvato mediante LDH, GPT, y NAD.^{4,5}

Fundamento del test

I-lactato + NDA^{LDH} piruvato + NADH + H⁺
Piruvato + l-glutamato^{GPT} l-alanina + α-cetoglutarato

Comprobaciones rutinarias

Antes de disponernos a analizar las muestras debemos asegurarnos del buen funcionamiento del fotómetro. Para ello lavaremos la cubeta con solución de limpieza, calibraremos el volumen de aspiración con 5.000 mcl de agua bidestilada y realizaremos un chequeo de posición de lámparas y de corrientes fotoeléctricas.¹

Una vez efectuadas estas operaciones pasaremos al análisis.

Como preparar el reactivo

La preparación del reactivo se efectúa tal como indican las instrucciones del Test-Combination lactato para la Medicina Deportiva. (Boehringer Mannheim ref. 1178750).

Introduciremos 30 ml de agua bidestilada con la solución tampón y disolveremos bien el NAD, GPT y LDH con esta solución.

La estabilidad del reactivo será de 8 horas a +15 - +25°C y de dos días a +2 - +8°C.

Control de qualitat

Per al control de qualitat, com ja s'ha dit anteriorment, haurem de tenir Precinorm S i mostres patró d'una concentració coneguda entre 4 i 20 mmol.l⁻¹.

El tractament que se li donarà al control Precinorm serà el mateix que a la mostra sanguínia.

Pel que fa als patrons preparats amb estàndard i àcid perclòric (Taula 1) també es tractaran com una mostra de sang, però no serà necessària la centrifugació.

Per assegurar-nos del bon funcionament de la tècnica llegirem sempre aquests controls abans de llegir les mostres de sang.

Anàlisi de la mostra

Tenint en compte que la longitud d'ona del nostre fotòmetre és de 340 nm, el volum de mostra emprat serà de 25 mcl i el de reactiu de 500 mcl (Taula 3).

El temps d'incubació a temperatura ambient és de 30 minuts; a 37°C es redueix a 5 minuts.

Les mostres es mesuraran davant el blanc i de cada mostra se'n faran dues determinacions; la preparació del blanc i de les mostres s'efectuarà tal com indica la Taula 3. Si el resultat no fos repetitiu, es realitzarà una tercera determinació.

Abans de llegir les mostres passarem el control de qualitat emprant Precinorm S per al rang inferior i patrons de concentració coneguda per als rangs mig i superior. Les concentracions emprades poden variar a criteri del tècnic, però es recomana utilitzar les de valors aproximats a 2, 4, 9, 14 i 19 mmol.l⁻¹ per poder valorar un rang ampli de mesura (Taula 1).

Precaucions

Essent la tècnica d'anàlisi del lactat molt sensible i tractant-se d'un micromètode, creiem que és

Control de calidad

Para el control de calidad, como se ha citado anteriormente, disponemos de Precinorm S y de muestras patrón de una concentración conocida entre 4 y 20 mmol. l⁻¹.

El tratamiento que se le dará al control Precinorm será el mismo que a la muestra sanguínea.

En cuanto a los patrones preparados con estándar y ac. perclórico (Tabla 1) también se tratarán como una muestra de sangre, pero no será preciso la centrifugación.

Siempre leeremos estos controles antes de leer las muestras de sangre para asegurarnos del buen funcionamiento de la técnica.

Análisis de la muestra

Teniendo en cuenta que la longitud de onda de nuestro fotómetro es de 340 nm, el volumen empleado de muestra será de 25 mcl y el de reactivo de 500 mcl (Tabla 3).

El tiempo de incubación a temperatura ambiente es de 30 minutos; a 37°C se reduce a 5 minutos.

Las muestras se medirán frente al blanco y de cada muestra se harán dos determinaciones, la preparación del blanco y de las muestras se efectuarán tal como indica la tabla 3. Si el resultado no fuera repetitivo, se realizará una tercera determinación.

Antes de leer las muestras pasaremos el control de calidad empleando Precinorm S para el rango inferior y patrones de concentración conocida para los rangos medio y superior. Las concentraciones empleadas pueden variar a criterio del técnico, pero se recomienda utilizar las de valores aproximados a 2, 4, 9, 14 y 19 mmol l⁻¹ para poder valorar un rango amplio de medición (Tabla 1).

Precauciones

Por ser la técnica de análisis del lactato muy sensible y por tratarse de un micrométodo cree-

Preparació de la determinació

	BR	MOSTRA
Solució reactiva	500 mcl.	500 mcl.
Sobrenedant	---	25 mcl.
Solució de desproteïnitzaçió (Ac. perclòric)	25 mcl.	---

Barrejar bé i esperar 30 minuts a temperatura ambient per a la incubació

de gran importància remarcar algunes de les causes que poden distorsionar el resultat de la determinació.

Pel que fa referència a la presa de mostra

- Volum incorrecte per penetració d'aire al capil·lar o per no enrasar-lo horitzontalment.
- Mala centrifugació o endarreriment excessiu d'aquesta.

Pel que fa referència a l'anàlisi

- Mal pipetat.

El micromètode fotoenzimàtic té exactitud i precisió suficients per al treball al laboratori de fisiologia de l'esport, (patrons de referència rang 2.30-19.61, CV mitjà = 3.38%, dif. mitjana = 3.65%).⁶ No obstant, recomanem emprar pipetes semiautomàtiques de volum fix i tenir gran rigor en el seu maneig per tal de reduir al màxim possible els errors deguts a la manipulació.

Ja que el mètode fotoenzimàtic és el més lineal dels que hem pogut valorar al nostre laboratori, (fins un valor superior a 22 mmol.l⁻¹, r=0.996,6 recomanem no efectuar cap tipus de dilució de la mostra.

Abans d'analitzar les mostres de sang, comprovarem sempre que el reactiu estigui en condicions i que els resultats del blanc i del control de qualitat siguin correctes.

Respectarem el temps d'incubació.

Resultats

Els resultats de les determinacions dependran del tipus de test realitzat així com de l'entrenament, motiu pel qual ens és difícil definir uns valors de normalitat.

Només cal indicar els valors en repòs d'1.0 - 1.8 mmol.l⁻¹, considerats normals en sang venosa, segons el criteri Boehringer Mannheim.

Valorant les dades obtingudes al nostre laboratori podríem donar, com a referència aproximada, un rang de mesura de 0.60 mmol.l⁻¹ a 21 mmol.l⁻¹, incloent valors basals i postesforç.

Agraïments

El nostre agraïment a Boehringer Mannheim Espanya i especialment al Sr. Carles Freixas pel seu suport i l'assessorament científic, així com a tots els meus companys del Centre d'Alt Rendiment pels seus encertats consells, estímulo i recolzament personal.

mos de gran importància ressaltar algunes de les causes que poden distorsionar el resultado de la determinación.

En cuanto a la toma de muestra

- Volumen incorrecto por penetración de aire en el capilar o por no enrasarlo horizontalmente.
- Mala centrifugación o retraso excesivo de la misma.

En cuanto al análisis

- Mal pipeteado.

El micrométodo fotoenzimático tiene una exactitud y precisión suficiente para el trabajo en el laboratorio de fisiología del deporte, (patrones de referencia rango 2.30-19.61, CV medio = 3.38%, dif. media = 3.65%).⁶ No obstante recomendamos emplear pipetas semiautomáticas de volumen fijo y tener gran rigurosidad en el manejo de las mismas para reducir en lo posible los errores debidos a la manipulación. Por ser el método fotoenzimático el más lineal de los que hemos podido valorar en nuestro laboratorio, (hasta un valor superior a 22 mmol l⁻¹, r=0.996),⁶ recomendamos no efectuar ningún tipo de dilución de la muestra.

Antes de analizar las muestras de sangre, comprobaremos siempre que el reactivo esté en condiciones y que los resultados del blanco y del control de calidad sean correctos.

Respetaremos el tiempo de incubación.

Resultados

Los resultados de las determinaciones dependerán del tipo de test realizado, así como del entrenamiento, por lo cual nos es difícil definir unos valores de normalidad.

Sólo indicar los valores en reposo de 1.0 - 1.8 mmol l⁻¹, considerados normales en sangre venosa, según criterio Boehringer Mannheim.

Valorando datos obtenidos en nuestro laboratorio podríamos dar como referencia aproximada un rango de medición de 0.60 mmol l⁻¹ a 21 mmol l⁻¹, incluyendo valores basales y postesfuerzo.

Agradecimientos

Nuestro agradecimiento a Boehringer Mannheim España y en especial al Sr. Carles Freixas por su apoyo y asesoramiento científico, así como a todos mis compañeros del Centre d'Alt Rendiment por sus acertados consejos, su estímulo y apoyo personal.

Bibliografia

1. Manual de instrucciones para el fotómetro 4020 HITACHI/Boehringer Mannheim Tokyo, Japan.
2. HOLLMANN, W.; MADER, A.; HECK, H.; LIESEN, H.; OLBRECHT, J.: Laktatdiagnostik. Die Entwicklung und praktische Bedeutung in der Sportmedizin und Klinischen Leistungsdiagnostik. *Medizintechnik* 105, 5: 154-162, 1985.
3. MADER, A; LIESEN, H.; HECK, H.; PHILIPPI, A.; ROST, R.; SHÜRCH, P.; HOLLMANN, W.: Zur Beurteilung der Sportartspezifischen Ausdauerleistungsfähigkeit im Labor. *Sportarzt Sportmed* 4: 80-88; 5: 109-112, 1976.
4. NOLL, F: L-(+)-Lactate. Determination with LHD, GPT and NAD. In: H.U. Bergmeyer, *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd. ed. (Methoden der enzymatischen Analyse, 3rd. ed. vol. II, Verlag chemie, Weinheim/RFA), Academic Press, Inc. New York and London, 1974.
5. SCHWAB, W.; TRITSCHLER, W.; KESSLER, A.CH.; BABLOK, W.: Neue enzymatische lactatbestimmung: Methodische Aspekte und Probengewinnung. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 17, 2: 65-70, 1979.
6. RODRÍGUEZ, F.A.; BANQUELLS, M.; PONS, V.; DROBNIC, F.; GALILEA, P.A.: A comparative study of blood lactate analytic methods. *International Journal of Sports Medicine*. Vol. 13, nº 6, pp. 462-466, 1992.

