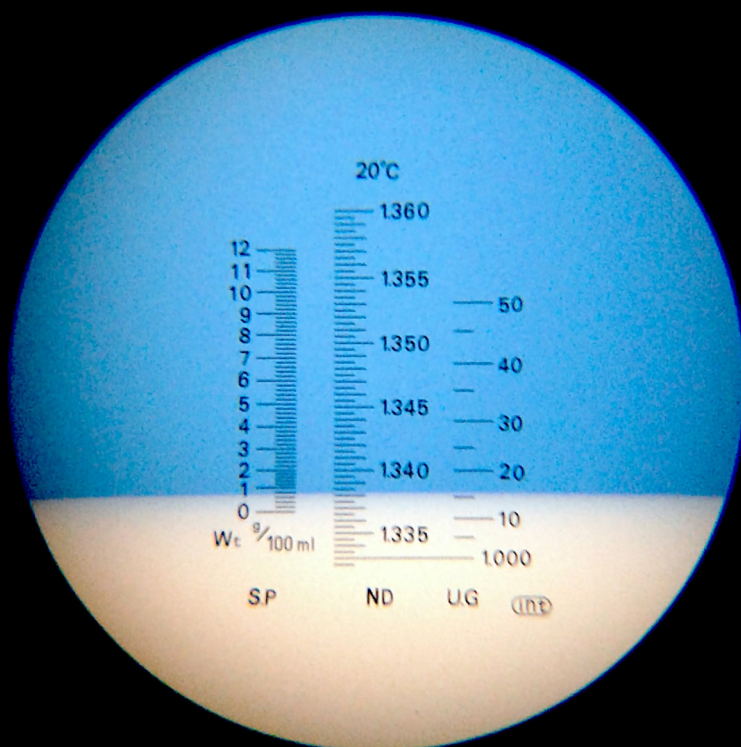


# El uso del refractómetro en el Laboratorio Clínico Veterinario

**MANUAL**

JOAQUÍN V. RODRÍGUEZ



Colaboradores

CORA  
COLLA

MELINA B.  
GINES

JULIANA S.  
OSORIO

GISEL  
SCHRÖEDER

  
**UNR**  
EDITORIA

**El uso del refractómetro en  
el Laboratorio Clínico Veterinario**

**MANUAL**

**El uso del refractómetro en  
el Laboratorio Clínico Veterinario**

**MANUAL**

**Dr. Joaquín V. Rodríguez**

**Colaboradores**

**Med. Vet. Mg. Cora Colla**

**Med. Vet. Melina B. Ginés**

**Lic. Biot. Juliana S. Osorio**

**Tec. Gisel Schröder**

Rodríguez, Joaquín V.

El uso del refractómetro en el Laboratorio Clínico Veterinario / Joaquín V. Rodríguez; contribuciones de Cora Colla ... [et al.]. - 1ª ed. Rosario: UNR Editora. Editorial de la Universidad Nacional de Rosario, 2018.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-987-702-310-7

1. Medicina Veterinaria. I. Colla, Cora , colab. II. Título.

CDD 636.089

Diseño interior y de tapa UNR Editora

ISBN 978-987-702-310-7

©Joaquín Rodríguez, 2018.

© Universidad Nacional de Rosario, 2018.

Queda hecho el depósito que marca la ley 11.723.

Ninguna parte de esta obra puede ser reproducida sin el permiso previo del editor.



Asociación de Universidades  
GRUPO MONTEVIDEO



Libro  
Universitario  
Argentino

**CiN REUN**

Red de Editoriales  
de las Universidades Nacionales  
de la Argentina

### **UNR Editora**

Editorial de la Universidad Nacional de Rosario

Secretaría de Extensión Universitaria

Urquiza 2050 - S2000AOB / Rosario, República Argentina

[www.unreditora.edu.ar](http://www.unreditora.edu.ar) / [editora@sede.unr.edu.ar](mailto:editora@sede.unr.edu.ar)

Impreso en Argentina

## AUTORES

### **Joaquín V. Rodríguez**

Bioquímico, Doctor en Bioquímica, Profesor Adjunto Dedicación Exclusiva, Laboratorio Centralizado Hospital Escuela de Grandes y Pequeños Animales (HEGyPA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario.

Investigador Principal Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Director del Centro Binacional (Argentina-Italia) de Investigaciones en Criobiología Clínica y Aplicada (CAIC), Universidad Nacional de Rosario.

[jrodrig@fbioyf.unr.edu.ar](mailto:jrodrig@fbioyf.unr.edu.ar)

### **Cora C. Colla**

Médica Veterinaria. Máster en gestión de calidad. Universidad de Nápoles Federico II. Especialidad en Diagnóstico Veterinario de Laboratorio, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

Jefa de trabajos prácticos dedicación exclusiva, Laboratorio Centralizado Hospital Escuela de Grandes y Pequeños Animales (HEGyPA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario.

Directora de Laboratorio Centralizado Hospital Escuela de Grandes y Pequeños Animales (HEGyPA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario.

[coritacolla@hotmail.com](mailto:coritacolla@hotmail.com)

### **Melina B. Ginés**

Médica Veterinaria. Docente Universitaria, Ayudantía de primera dedicación simple, Laboratorio Centralizado Hospital Escuela de Grandes y Pequeños Animales (HEGyPA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario.

[ginesmelina@gmail.com](mailto:ginesmelina@gmail.com)

**Juliana S. Osorio**

Licenciada en Biotecnología. Carrera de especialización en Ciencia de los alimentos (Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR). Carrera de especialización en gestión de la vinculación tecnológica (CEI, UNR).

Becario de doctorado UNR, investigación en Centro Binacional (Argentina-Italia) de investigaciones en Criobiología Clínica y Aplicada (CAIC), UNR.

[osoriojulianasoledad@hotmail.com](mailto:osoriojulianasoledad@hotmail.com)

**Gisel Schröder**

Nodocente agrupamiento técnico en Laboratorio Centralizado Hospital Escuela de Grandes y Pequeños Animales, (HEGyPA). Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario.

[gisel\\_@hotmail.com](mailto:gisel_@hotmail.com)

## PRÓLOGO

En el campo de la medicina veterinaria, tradicionalmente se ha utilizado la refractometría para las determinaciones de los sólidos totales del plasma y de la densidad urinaria. Las ventajas de esta técnica respecto de la tradicional urinometría que se utiliza en el laboratorio de análisis clínicos en humanos comprenden el volumen mínimo de muestra, la rapidez y la sencillez de la medición. Otra ventaja es el bajo costo del instrumento utilizado (refractómetro de mano).

No obstante las ventajas descriptas, hemos observado en la literatura muy escasa información, especialmente en textos utilizados en docencia, acerca de los límites, interferencias, cuidado y calibración del instrumento. Por estas razones nos propusimos redactar este pequeño manual en el que hemos priorizado la utilización y práctica de esta metodología analítica.

En el texto se han introducido, bajo el título conceptos útiles, los conceptos básicos necesarios para comprender las bases de la refractometría y los parámetros que se estiman en la práctica analítica. También para las determinaciones de proteínas séricas, sólidos totales y densidad urinaria, las ventajas y límites de cada medición, con especial énfasis en la solución de los problemas más comunes que se presentan.

Se describe toda la información que puede obtenerse con cálculos simples o de tablas publicadas acerca de parámetros poco utilizados en la práctica médica pero de indudable valor para el diagnóstico.

Finalmente se ha incluido un capítulo acerca del mantenimiento, cuidado y calibración de los refractómetros de mano. También hemos introducido la utilización de una metodología analítica muy poco empleada en nuestro país, la osmometría de suero y orina. En especial hemos comparado metodológicamente el valor de la osmometría en la orina con el parámetro densidad urinaria.

Quienes hemos escrito este texto, como docentes de la Universidad Pública, hemos decidido que esté disponible libremente en la web para los estudiantes de Veterinaria que quieran utilizarlo.

En la redacción y experimentos presentados han colaborado docentes de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNR y miembros del Centro Binacional (Argentina-Italia) de Investigaciones en Criobiología Clínica y Aplicada (CAIC) de la UNR. Mi agradecimiento a ellos por la dedicación y el esfuerzo realizado.

**Joaquín Rodríguez**  
*Casilda, octubre de 2018*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A Claudio TIRIBELLI; Sabrina CORSUCCI; Sandra LEAL; Pablo GIRAUDI*

Quienes desde el Centro *Studi Fegato*-Fundación Italiana Fegato, Trieste, Italia, nos brindaron su constante apoyo, su afecto y ayuda material que facilitaron la realización de investigaciones que condujeron a la redacción de este manual.

*A Gustavo SANMIGUEL* Méd. Vet. Ex Decano de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNR

*A Arsenio ALFIERI* D.S.P. Méd. Vet. Decano de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNR

Quienes me recibieron en la Facultad de Ciencias Veterinarias brindándome la más amplia libertad académica para desarrollar actividades de docencia e investigación durante el período 2012-2018.

A docentes y Nodocentes de la Facultad de Ciencias Veterinarias por su apoyo y hospitalidad.

A los estudiantes que asistieron a las clases del curso “Práctica intensiva en Bioquímica Clínica de pequeños animales” por el interés la curiosidad y entusiasmo demostrado que hicieron que la etapa final de mi carrera docente haya sido estimulante y activa.

**Joaquín Rodríguez**  
*Casilda, octubre de 2018*

## CONTENIDO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>11</b>
<b>Conceptos útiles</b>	
Refracción	
Ley de Snell	
Determinación del índice de refracción ( <b>n</b> )	
Factores que inciden sobre el índice de refracción	
Diseño de un refractómetro de mano, escalas y unidades	
Cómo se utiliza el refractómetro de mano	
Diseño de un refractómetro de mano digital	
Cómo se utiliza el refractómetro de mano digital	
Tratamiento de las muestras de orina, plasmas o sueros y líquidos peritoneal y pleural para refractometría	
El problema del "carryover" en las determinaciones refractométricas	
 <b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>Determinación de la concentración de proteínas totales (PT) en suero o plasma en veterinaria y medicina humana por refractometría</b> .....	<b>19</b>
Conceptos útiles	
El concepto de Sólidos Totales (ST)	
¿Cómo se realiza la conversión del índice de refracción a concentración de proteínas?	
Causas de error relacionados con las muestras en la determinación de proteínas por refractometría	
Diferencias interespecies en la determinación de proteínas totales	
Determinación de proteínas totales en fluidos corporales	
Estimación de Fibrinógeno mediante refractometría	
Estimación del agua sérica	
 <b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>25</b>
<b>Determinación de la concentración de solutos en orina por refractometría</b>	
Conceptos útiles	
Densidad	
Peso Específico	
Densidad versus Peso Específico	
Determinación de la Densidad urinaria (DU) mediante la refractometría	

## Osmometría

¿Qué hacer cuando nos encontramos con muestras cuya DU excedieron el límite de medición del instrumentos (DU > 1.050)?

Cálculo de la DU de orinas muy concentradas (DU > 1.050)

Estimación de la Osmolalidad de la orina a partir de la DU medida por refractometría

Efecto de los constituyentes anormales de la orina sobre la determinación refractométrica de la DU: Correcciones a realizar en la DU debida a la presencia de altas concentraciones de Glucosa o proteínas en orina

El problema de la refractividad de la orina de felinos

Valores de la DU de orinas de animales sanos

## **CAPÍTULO 4** ..... **32**

### **Información que podemos obtener con el refractómetro de uso clínico**

Refractometría de plasma o suero (temperatura 20 °C)

Sólidos totales (TS) (g/100 mL de suero o plasma)

Sólidos totales en % en peso (TS %) (g/100 g suero)

H<sub>2</sub>O % en peso (g/100 g de suero)

Concentración de H<sub>2</sub>O (CW) (gH<sub>2</sub>O /100 mL de suero)

Densidad del suero o plasma (D<sub>20</sub>/D<sub>20</sub>)

Concentración de Sólidos totales relativos al H<sub>2</sub>O (g TS/100 g H<sub>2</sub>O)

Refractometría de orina (temperatura 20 °C)

Densidad de orina

Sólidos totales en % en peso (TS %)(g/100g suero)

H<sub>2</sub>O % en peso (g/100 g de orina)

Sólidos totales (TS) (g/100 mL de orina)

Concentración de H<sub>2</sub>O (CW) (gH<sub>2</sub>O /100 mL de orina)

Concentración de Sólidos totales relativos al H<sub>2</sub>O (g TS/100 g H<sub>2</sub>O)

Índice de refracción (n) de soluciones de solutos conocidos (temperatura 20 °C)

## **CAPÍTULO 5** ..... **35**

Selección y mantenimiento de refractómetros

Control de calidad para los refractómetros

## **ANEXO** ..... **37**

### **Osmometría**

Definiciones

Osmolalidad y Osmolaridad

Cómo se determina la osmolalidad de líquidos biológicos

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS** ..... **41**

## CAPÍTULO 1

### Conceptos útiles

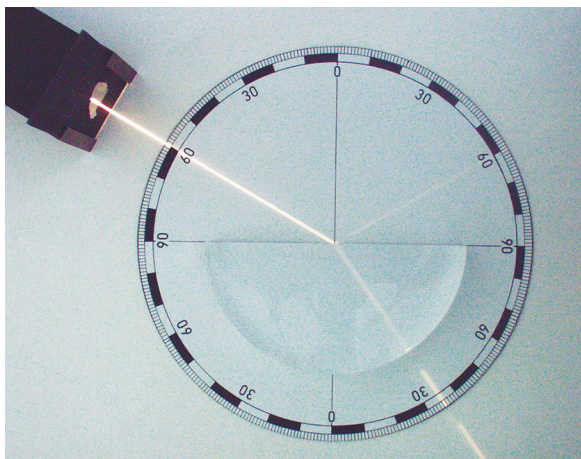
#### Refracción

La refracción es el fenómeno producido por el desvío de la luz cuando pasa a través de dos sustancias transparentes.

Es el cambio de dirección y velocidad que experimenta una onda al pasar de un medio a otro con distinto índice refractivo.

Sólo se produce si la onda incide oblicuamente sobre la superficie de separación de los dos medios. Esto se explica como un cambio de velocidad de la onda.

Ejemplo: ver Figura 1.



**Figura 1**

Fuente: Wikipedia (<https://es.wikipedia.org/wiki/Refracci%C3%B3n#/media/File:Refracci%C3%B3n.svg>)

La refracción atraviesa más lentamente los líquidos y sólidos que los gases o el vacío. Cambia de dirección al atravesar materiales de distinta densidad. Ese cambio de dirección se puede medir o estimar y se denomina *índice de refracción (n)*. Es una característica física de cada material. Esta constante relaciona la velocidad de la luz en el vacío a la velocidad de la luz en el medio.

### Ley de Snell

La ley de Snell define el comportamiento de la luz cuando pasa entre dos medios de acuerdo al ángulo de incidencia ( $\theta_i$ ) y el rayo refractado ( $\theta_r$ ), entonces el índice de refracción entre esos dos materiales será:

$$n_i \cdot \text{sen } \theta_i = n_r \cdot \text{sen } \theta_r$$

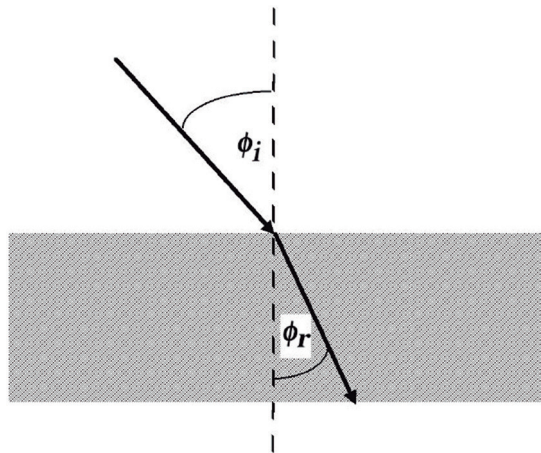


Figura 2

El **n** en el vacío es 1 y en los gases es aproximadamente igual a 1. Para un rayo que pasa desde el vacío al aire, la ley de Snell es:

$$n = \text{sen } \theta_i / \text{sen } \theta_r$$

### Determinación del índice de refracción (n)

El valor de **n** varía de acuerdo a la longitud de onda ( $\lambda$ ) de la luz incidente, la luz de mayor  $\lambda$  (luz roja) se desvía menos que la luz de menor  $\lambda$  (luz azul). Esta variación en **n** genera que la luz blanca se disperse cuando pasa a través de un prisma de cristal.

Para determinar con exactitud el **n** de una sustancia se requiere que la luz incidente tenga un ancho de banda relativamente estrecho. Por ejemplo cuando se necesita

una medición altamente precisa se utiliza la banda de emisión D del Sodio (luz amarilla - 589 nm). La ecuación siguiente expresa el  $n$  del agua pura:

$$n_D^{20^\circ} = 1.3330$$

siendo  $20^\circ$  la temperatura a la que se hace la medición y D la luz del sodio.

Otro ejemplo: una solución de Glucosa 5% tiene en las mismas condiciones:

$$n = 1.3402$$

### **Factores que inciden sobre el índice de refracción**

En solución acuosa:

1. el soluto
2. su concentración
3. la temperatura

Cada soluto tiene un  $n$  característico para su concentración en g/dL llamado refractividad específica. El  $n$  de la solución y su concentración son lineales en un amplio rango de concentraciones, si se aumenta la temperatura, el  $n$  disminuye debido a la expansión de volumen del solvente.

El  $n$  de una solución que contiene una mezcla de solutos con refractividades específicas similares es proporcional a la concentración del total de los sólidos disueltos independientemente de las proporciones de los mismos.

***Si se puede medir el  $n$  de una solución a temperatura estandarizada se puede entonces estimar su concentración en solutos.***

El refractómetro se desarrolló para hacer precisamente esto.

### **Diseño de un refractómetro de mano, escalas y unidades**

El diseño básico del refractómetro de Abbe ha cambiado muy poco desde su invención en los años 1900, en cambio el refractómetro de mano fue diseñado en el año 1930 por la empresa inglesa *Bellingham + Stanley* para la determinación de sacarosa en jugo de caña de azúcar. En la Figura 3, se presenta su diseño, en el que la luz pasa a través de la muestra y luego por una serie de prismas produciendo una línea de demarcación sobre un retículo. Este conjunto de prismas reducen la dispersión de la luz blanca permitiendo de esta manera el uso de la luz ambiente para su iluminación. Se han desarrollado mecanismos para compensar los cambios de temperatura (soporte bimetálico). Se miden simultáneamente la muestra y agua destilada, reduciéndose así el error debido a ligeras diferencias de temperatura. La

diferencia entre el  $n$  de la muestra ( $n_s$ ) y el del agua destilada a la misma temperatura ( $n_0$ ) que es  $(n_s - n_0)$  tiene menor variación referida a temperatura que el  $n$  solo y permite además, una mejor comparación de los resultados entre laboratorios.

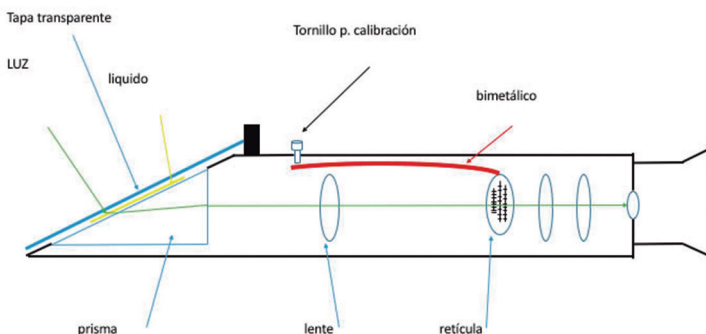


Figura 3. Diseño de un refractómetro de mano

También se ha formulado una segunda unidad de medición, la refractividad ( $r$ ) para simplificar el informe de los resultados de las mediciones simultáneas de  $n_s$  y  $n_0$ . Muchos refractómetros incluyen este tipo de escala.

$$r = 10000 \cdot (n_s - n_0)$$

Ejemplo: si tomamos una lectura proveniente de una muestra de un líquido biológico, utilizando la escala de índice de refracción obtenemos el siguiente valor:

$n_s = 1.3450$ , le restamos el  $n_0 = 1.3330$  correspondiente al agua destilada, la diferencia es 0.0120 que multiplicada por 10.000 nos da un  $r = 120$ .

Goldberg inventó el primer refractómetro de mano con compensación de temperatura que es el más caro y exacto de los refractómetros manuales, incluye escalas de  $n$ ,  $r$ , **proteínas** (g/dL) y **peso específico** de orina. En la Figura 4A se muestra la escala del instrumento de mano *Reichert TS Meter* que contiene las escalas para **proteínas**, **Peso específico de orina (UG)** y la refracción ( $r$ ). En cambio en la Figura 4B se muestra la retícula del refractómetro clínico de mano *Alla France* que contiene tres escalas: **SP** –*serum protein*–, **ND** –*refraction index*– y **UG** –*urine gravity*–.

Un punto importante a considerar para el uso diario del refractómetro es que se pueda corregir el índice de refracción ( $n$ ) del agua destilada (1.3330) o el 1.000 en la escala de peso específico de orina (calibración del cero del instrumento), sino es probable que las mediciones realizadas no sean correctas (ver calibración del refractómetro).

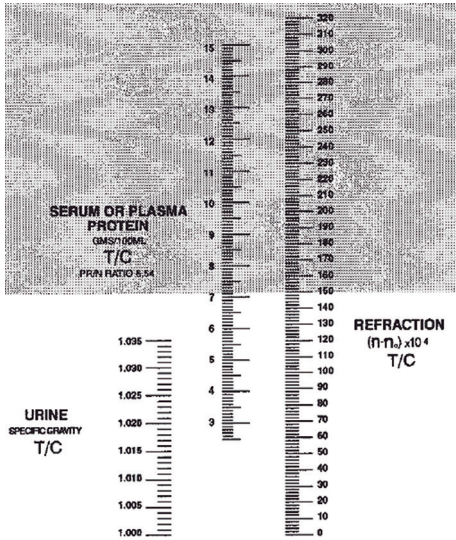


Figura 4A. Retículo refractómetro TS Reichert

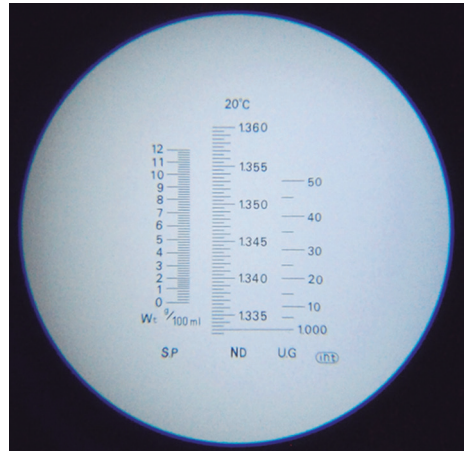


Figura 4B. Retículo refractómetro Alla France

### Cómo se utiliza el refractómetro de mano

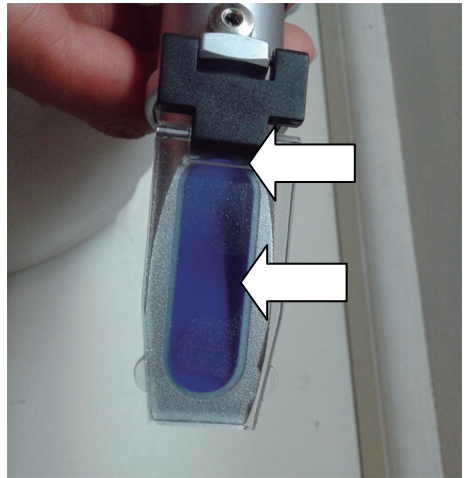
En Figura 5 A se muestra cómo se utiliza el refractómetro de mano. Para ello basta con colocar una gota de orina o suero (50  $\mu$ L) sobre el prisma y luego dirigir el instrumento hacia una fuente de luz, se leen las escalas de **DU (UG)**, **n** o **Proteínas (SP)** en el límite entre el campo claro y el campo oscuro (azul). En la Figura 5B se muestra el retículo con la lectura de una orina cuya densidad es 1.016 que se corresponde a un **n= 1.3380**. Es importante que la muestra se distribuya homogéneamente sobre el prisma (Figura 5B), y no de la manera que se muestra en la Figura 5C ya que daría una lectura errónea.



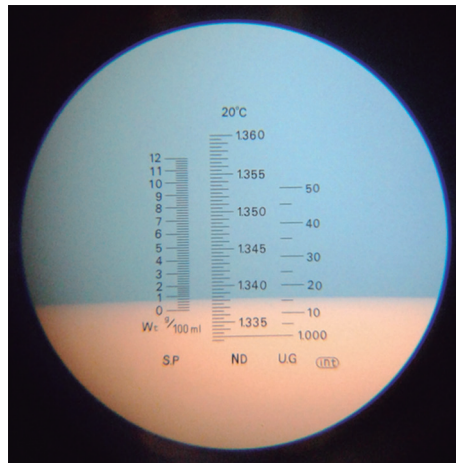
Figura 5A. Carga de la muestra



**Figura 5B.** distribución uniforme de la muestra sobre el prisma



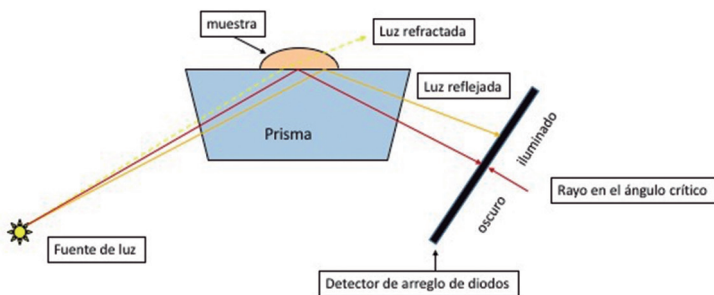
**Figura 5C.** distribución no homogénea de la muestra señalada por las flechas



**Figura 5D.** retícula que muestra la DU de una orina (1.016) y el  $n$  (1.3380)

### Diseño de un refractómetro de mano digital

En la Figura 6 se presenta el diseño de un refractómetro de mano digital (tomado de *Bellingham + Stanley Ltd* / Boletín técnico nº R001, Título: Principios de Refractometría).



**Figura 6.** Refractómetro de mano digital

### Cómo se utiliza el refractómetro de mano digital

El refractómetro digital funciona con baterías, por lo tanto se enciende, se deja estabilizar un par de minutos, el instrumento pasa a calibración automáticamente, se coloca unas gotas de agua destilada y se activa la calibración, durante este paso se enciende la luz que ilumina el prisma y el instrumento hace la lectura. Realizado este paso, se vuelca el agua, se seca con papel tisú y se carga con las muestras de orina o suero, se activa la medición y se obtiene el resultado en segundos. Luego se descarta la muestra biológica se seca con papel y se carga con la nueva muestra. Para obviar el fenómeno de carryover se puede enjuagar el prisma con agua destilada. Por lo general los instrumentos indican en el visor el nivel de carga de la batería y señalan la necesidad de su cambio mediante señales en el visor del instrumento (Figura 7).



**Figura 7.** Imagen del refractómetro digital Atago PAL-RI para determinación de índices de refracción en un rango de valores de 1.3306 a 1.5284. En el visor puede observarse el nivel de carga de baterías

### **Tratamiento de las muestras de orina y fluidos peritoneales para refractometría**

Algunos autores (1) recomiendan centrifugar las muestras de orina antes de hacer la determinación refractométrica de la DU, si las orinas fueron congeladas es posible que pueda observarse precipitación de cristales. La formación de cristales por el congelamiento a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  está ligado a la concentración de calcio en orina, este proceso es también afectado por el pH urinario. Dichos cristales son mayormente oxalato de calcio dihidrato y calcio amorfo (32). Estos precipitados pueden depletar a la orina de proteínas urinarias y de iones  $\text{Ca}^{++}$ , por ello los sedimentos inducidos por el congelamiento pueden afectar el análisis proteico y la calciuria (32). Afortunadamente el problema se resuelve fácilmente: se deberá llevar la temperatura de la muestra a la temperatura ambiente y luego agitar vigorosamente la muestra para redissolver los precipitados. En el caso de turbiedad, utilizar el sobrenadante después de centrifugar la muestra  $3000\text{ g} \times 5\text{ min}$  (5). En el caso de fluidos peritoneales, pleurales y pericárdicos. George (11) recomienda centrifugar las muestras a  $1000\text{ g} \times 3\text{ minutos}$ .

### **El problema del "carryover" en las determinaciones refractométricas**

En el idioma inglés el término "carryover" se traduce como "remanente" y en nuestro caso está referido a los restos de muestras que permanecen sobre el prisma y cubierta del refractómetro después de hacer la medición. No obstante el procedimiento tradicional de medición indica secar con papel tisú el prisma y la tapa del instrumento, es posible que si en la muestra previa algún componente tenía alta concentración, pueda de esta manera contaminar el resultado de la muestra posterior. Ello fue demostrado por Hunsaker y col. (15) quienes haciendo determinaciones con estándares de alto y bajo contenido proteico en un refractómetro digital y procediendo con y sin enjuagues entre muestra y muestra. Ellos observaron un carryover del 8.5%, el que fue llevado al 0% con un simple lavado del prisma con agua destilada. Los mismos autores (43) realizando la validación de un refractómetro digital de mano para DU observaron un carryover menos significativo que para proteínas y recomiendan el lavado con agua destilada entre muestra y muestra de orina. Por lo tanto aconsejamos enjuagar con un chorro de agua destilada (utilizando una Piseta plástica) el prisma y cubierta del instrumento después de realizada la medición refractométrica.

## CAPÍTULO 2

### Determinación de la concentración de proteínas totales (PT) en suero o plasma en medicina humana y veterinaria por refractometría

A partir de los años 60 la refractometría comienza a ser utilizada como una técnica rápida para la determinación de **PT** en suero o plasma.

El ángulo de refracción producido por una muestra de suero o plasma se debe a la concentración combinada de todos sus solutos, también llamados "**Sólidos Totales**" (**ST**) o "**Total Solids**" (**TS**) en inglés. Las proteínas son el soluto predominante en este tipo de muestra, pero también las sustancias no-proteicas como electrolitos, glucosa, urea y lípidos, contribuyen al ángulo de refracción.

Para que la determinación refractométrica de PT sea exacta se requiere la constancia de esos solutos en el suero.

La conversión de **n** a proteínas totales usando el retículo del refractómetro o tablas publicadas, asume que los solutos no-proteicos deben contribuir al **n** de una manera predecible.

Se puede clasificar a la refractometría como una técnica para medir **ST** basados en proteínas y puede ser influenciada por los **ST** en la muestra.

#### Concepto de Sólidos Totales (ST)

El término Sólidos Totales ha producido mucha confusión cuando se informan los resultados de la refractometría de proteínas. La corporación AO (American Optics) contribuyó a esto cuando llamó a su instrumento "**TS Meter**" aunque fue calibrado para medir concentración de proteínas.

*Algunos autores utilizan equivocadamente el término "**concentración de sólidos totales**" cuando informan proteínas medidas por refractometría, esto es inexacto*

porque la escala del instrumento está calibrada en concentración de proteínas en g/dL. Sería correcto en el caso de que el instrumento tuviese una escala calibrada en concentración de sólidos totales en g/dL (suelen encontrarse algunos instrumentos antiguos).

Entonces es importante aclarar que **Proteínas totales** y **ST** no son términos intercambiables (9).

En estado de salud la concentración de **ST** en suero o plasma es aproximadamente 1.5 a 2.0 g/dL mayor que la concentración de proteínas. Si en nuestro refractómetro determinamos **Proteínas totales** y queremos obtener los **ST** correspondientes a la muestra, debemos utilizar las tablas provistas por *Reichert* (37, 38) que se pueden descargar de la web o referirnos al excelente libro de *Wolf* (42).

### ¿Cómo se realiza la conversión de *n* a una concentración de PT?

*American Optical* basó el diseño de su refractómetro sobre un factor de conversión entre *n* y concentración de proteínas diseñado por *Wolf* (40), quien comparó el *n* de muestras de suero humano y de roedores a la concentración de proteínas determinada por Biuret (luego verificados con la técnica de micro kjeldahl). Usó un factor de 6.54% para calcular la cantidad de Nitrógeno en Albúmina. Los refractómetros de *Reichert* (sucesor de *AO*) y los de *Misco* usan este factor de conversión. En cambio los refractómetros de *Atago* (Japón) usan un factor diferente con el que se obtiene una concentración menor de proteínas que los obtenidos con el factor de *Wolf*. Esta situación ha llevado a que algunos autores japoneses hayan publicado tablas para corregir los valores de PT obtenidos con instrumentos japoneses (23).

### Causas de error relacionados con las muestras en la determinación de proteínas por refractometría

En la determinación de proteínas totales (PT) mediante refractometría, el aumento de los sólidos no-proteicos genera un incremento artificial de la concentración de proteínas. Los compuestos conocidos que pueden causar errores reconocibles son aquellos que pueden agregar cantidades de 0.5 a 1.0 g/dL, tales como el colesterol, la glucosa, la urea, lipoproteínas, etc. Otros autores han demostrado que la adición *in vitro* de urea (273 mg/dL) o glucosa (649 mg/dL) a un suero incrementa falsamente la conc. de proteínas de 0.4 a 0.5 g/dL (22), el agregado de NaCl a una concentración de 250 mmol/L también provoca una determinación refractométrica de proteínas aumentada en 0.4 g/dL. Si se adiciona glucosa a una muestra de sangre canina en concentraciones de 500 y 1.000 mg/dL se incrementa la concentración de proteínas medida por IR, en cambio si se agregan concentraciones de 100 o 200 mg/dL no se verifican cambios en la concentración proteica medida (5). Respecto

a la concentración de Glucosa, Hunsaker (15) demostró utilizando un refractómetro digital de mano que las concentraciones superiores a 267 mg/dL producen una interferencia significativa en la determinación refractométrica de PT. Estos autores, también encontraron una significativa interferencia por triglicéridos a concentraciones mayores a 580 mg/dL (15). Legendre y col. (16) estudiaron el efecto de las concentraciones elevadas de urea en suero de perros o gatos sobre la estimación de PT y demostraron que a concentraciones de urea > 47 mg/dL y > 64 mg/dL en el perro y gato respectivamente, incrementan las concentraciones de PT obtenidas por refractometría. Por ello sugieren que en presencia de uremia alta realizar las determinaciones de PT utilizando la reacción colorimétrica del Biuret.

La hemólisis también aumenta el IR, aunque existen contradicciones en este aspecto. Sutton (34) observó que la hemoglobinemia no permite ver claramente la línea de demarcación en el retículo del refractómetro y esto puede dar una lectura falsa, por ello se sugiere que solamente se utilice el refractómetro en presencia de hemólisis cuando se pueda observar una clara demarcación de la línea en el retículo. También demostró que la lipemia incrementa el IR. Por otra parte, Rubini y col. (28) usando datos experimentales demostraron que las variaciones en la relación Albúmina/Globulinas (A/G) no es una causa de error en la determinación de proteína como se detalla en los prospectos de algunos instrumentos. El exceso de EDTA en tubos que fueron llenados con poca sangre también aumenta falsamente la concentración de PT(5). Estepa y col. (7) observaron que en la determinación refractométrica de PT en fluido peritoneal de equinos, la presencia del anticoagulante K<sub>3</sub>EDTA (concentración > 5 µmol/mL) produce sobreestimación del valor de PT, en cambio la presencia de Litio-Heparina no influencia los valores obtenidos por RF. Con respecto a la hiperbilirrubinemia también existen contradicciones en la literatura, sin embargo Gupta (10) y Stockham (31) han informado que la hiperbilirrubinemia hasta 41.5 mg/dL no interfiere con la determinación refractométrica de proteínas totales en muestras de origen canino.

Un punto interesante en la determinación de PT por refractometría, cuando se quiere establecer la linealidad de la respuesta del instrumento con la concentración de PT, es el efecto del diluyente de la muestra. En este caso Hunsaker (15) ha demostrado que en el caso de utilizar solamente agua destilada observó una disminución de la recuperación respecto de la utilización de solución fisiológica (NaCl 0.9%) como diluyente. Esto estaría indicando que el diluyente contribuyó a la densidad de la solución y a la refracción de la misma (24), por eso se recomienda que las muestras de suero o plasma deben ser diluidas con solventes que contengan cantidades de sólidos totales de la fase no proteica de la muestra (12). En este caso la solución fisiológica sería una buena aproximación a la resolución del problema.

### Diferencias interespecies en la determinación de proteínas totales

La refractometría y el Biuret correlacionan bien con muestras de suero humano. En muestras de suero y plasma de origen aviar es menos consistente, por ejemplo Lumeij y col. (19) determinaron que los valores de plasma y suero provenientes de palomas (*Columba livia domestica*) determinados por refractometría eran mayores respecto a los estimados por el Biuret. Una probable causa sería los altos valores de Glucosa plasmática en esta especie (20). Dichos autores no recomiendan determinar PT en muestras aviares utilizando refractometría.

### Determinación de proteínas en otros fluidos corporales

Es posible utilizar la refractometría para determinar las concentraciones de proteínas de fluido peritoneal, pericardial y pleural. En la mayor parte de los refractómetros la menor lectura posible de proteínas se corresponde a 2.0 g/dL, pero podemos obtener valores de hasta 0.6 g/dL en tablas de conversión usando la escala de índice de refracción (9,11,39,40). En la Tabla 1 se muestran valores de índice de refracción y concentración de proteínas obtenidas de Wolf (40).

**Tabla 1.** Valores de índice de refracción obtenidos con un refractómetro de mano en fluidos biológicos y sus equivalentes en concentración de proteínas cuando los valores de lectura directa de la concentración de proteínas están por debajo del límite de la escala (lecturas < 2 g/dL)

Índice de Refracción (n)	Concentración de proteínas en líquidos corporales (g/dL)	Densidad urinaria (g/mL)
<1.3376	<1.0	<1.013
1.3376	1.0	1.013
1.3378	1.1	1.014
1.3380	1.3	1.014
1.3382	1.4	1.015
1.3384	1.5	1.015
1.3385	1.6	1.016
1.3387	1.7	1.016
1.3389	1.8	1.017
1.3391	1.9	1.017
1.3391	1.9	1.017
1.3393	2.0	1.018
1.3395	2.1	1.018
1.3397	2.2	1.019
1.3399	2.3	1.019
1.3401	2.4	1.020
1.3402	2.5	1.020

Se incluye la tabla de valores de DU para el caso en el que el refractómetro utilizado no tenga una escala de índice de refracción, pero es importante aclarar que esta escala no es exacta para determinar la concentración proteica de fluidos corporales y no debería ser utilizada para esto de forma rutinaria, sino como una aproximación rápida. Esta escala está calibrada específicamente para orina y da resultados altos si se utiliza en fluidos peritoneales (18,41).

Matthews y col. (21) han demostrado el valor de la refractometría en análisis del fluido peritoneal en equinos con crisis abdominal aguda. Los resultados de este trabajo sugieren que el análisis de una muestra de fluido peritoneal puede contribuir a la decisión sobre la necesidad de cirugía aunque no es una panacea diagnóstica. Cuando se evalúa el color y la concentración de proteínas totales en muestras de fluido abdominal podemos tener la confianza de identificar equinos con una patología que responde a tratamiento médico respecto de aquellas con lesiones que requieren cirugía. Las concentraciones de proteínas totales estimadas por refractometría  $< 2$  g/dL son consideradas normales, mientras que las concentraciones  $> 2$  g/dL serán consideradas patológicas. Mientras que el color y aspecto del fluido normal será amarillo y transparente. Un aspecto turbio y de color naranja a rojo (serosanguinolento) y otros colores (rojo oscuro) será índice de anormalidad que en conjunto con el valor anormal de proteínas será determinante de la necesidad de cirugía.

### **Estimación de Fibrinógeno mediante refractometría**

La hiperfibrinogenemia es un indicador estándar de inflamación en herbívoros. Puede hacerse como una extensión de la determinación de PT por refractometría, precipitándolo de la muestra de plasma por calentamiento a  $56$  °C (35). Brevemente: se obtiene sangre en dos tubos de microhematocrito y se centrifugan. Del primero se determina la concentración de PT por refractometría, el segundo se calienta a  $56$  °C por 10 minutos, aquí el Fibrinógeno se precipita por desnaturalización térmica, se centrifuga nuevamente y se determina por refractometría la concentración de PT. Se asume que la diferencia obtenida entre las dos lecturas es la concentración de Fibrinógeno. Este procedimiento determina la concentración de Fibrinógeno dentro de los valores normales y en hiperfibrinogenemia.

El límite de detección de la refractometría para proteínas es de  $100$  mg/dL por tanto no debería utilizarse esta técnica para determinar fibrinógeno si el paciente tiene hipofibrinogenemia (6).

### **Estimación del agua sérica en suero**

Utilizando el refractómetro podemos determinar la concentración de  $H_2O$  sérica: gramos de  $H_2O$  por decilitro de suero ( $g_{H_2O}/dL$ ).

Cuando la concentración de proteínas séricas se incrementa ésta desplaza al  $H_2O$  disminuyendo su concentración. Las tablas desarrolladas por Wolf incluyen la concentración de agua sérica y concentración de proteínas en un amplio rango expresadas como **n o r**.

Los electrolitos como el  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Cl^-$  están disueltos en la fase acuosa del suero ( $mmol/L_{H_2O}$ ) y se miden como  $mmol/L_{suero}$ . Los electrodos ión selectivo dan el valor de electrolitos en  $mmol/L_{H_2O}$  en muestras no diluídas. La conversión de electrolitos desde  $mmol/L_{suero}$  a  $mmol/L_{H_2O}$  cuando han sido determinados por otra técnica diferente a electrodos ión específicos es simple. Se debe determinar el agua sérica por refractometría y luego las concentraciones obtenidas en electrolitos se dividen por el agua sérica.

## CAPÍTULO 3

### Determinación de la concentración de solutos en orina por refractometría

#### Conceptos útiles

##### Densidad

Los pesos relativos de iguales volúmenes de sustancias se muestran por sus **densidades** o **pesos específicos** (33).

**Densidad:** es la masa por unidad de volumen de una sustancia. Ej: g/mL

Se expresa en g/cc, como el gramo es la masa de 1 cc de H<sub>2</sub>O a 4 °C, la densidad del H<sub>2</sub>O es 1 g/cc. Como la USP (*United States Pharmacopeia*) establece que 1 mL puede ser equivalente a 1 cc, para nuestros propósitos la densidad ( $\rho$ ) del H<sub>2</sub>O es 1 g/mL.

Otros ejemplos: 1 mL de Hg pesa 13.6 g entonces su  $\rho_{\text{Hg}} = 13.6 \text{ g/mL}$

La  $\rho$  se calcula dividiendo la masa por el volumen: 10 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pesan 18 g entonces la

$$\rho_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 18 \text{ g}/10 \text{ mL} = 1.8 \text{ g/mL}$$

##### Peso Específico (PE) - (*specific gravity* en inglés)

El **PE** es la relación del peso de una sustancia al peso de igual volumen de otra sustancia elegida como estándar al mismo tiempo.

El H<sub>2</sub>O se utiliza como estándar para los **PE** de líquidos y sólidos (para los gases es el H<sub>2</sub>).

El **PE** se puede calcular dividiendo el peso de una sustancia por el peso de igual volumen de agua.

Ejemplo:

10 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pesan 18 g y 10 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  pesan 10 g, entonces el  
 $\text{PE } \text{H}_2\text{SO}_4 = \text{peso } 10 \text{ mL } \text{H}_2\text{SO}_4 / \text{peso } 10 \text{ mL de } \text{H}_2\text{O} = 18/10 = 1.8,$   
el PE no tiene unidades.

La temperatura a la que se determina el PE en la USP es a 25 °C (a excepción del alcohol que se hace a 15.56 °C).

### **Densidad versus Peso Específico**

La **densidad** de una sustancia es un número concreto. Ejemplo: 1.8 g/mL, mientras que el **PE** es una relación entre cantidades, es adimensional. Ejemplo: 1.8.

Mientras que la densidad puede variar de acuerdo al sistema de medidas usado, el PE no, es un valor constante para cada sustancia. Para el sistema métrico decimal el PE y la Densidad son iguales como resultado de la definición de gramo pero no lo son cuando se utilizan sistemas como el apotecario.

### **Determinación de la Densidad/Peso específico urinario mediante la refractometría**

Los refractómetros clínicos tienen una escala indicada como UG (*urine gravity*) o USG (*urine specific gravity*) o PE urinario, la que es en nuestro caso equivalente a la densidad de la orina (DU). Por lo tanto de ahora en adelante usaremos la sigla DU como sinónimo de PE urinario/UG o USG.

El método de referencia para la determinación de la Densidad de la orina está basado en la comparación del peso de un volumen de orina antes y después de llevarlo a sequedad (determinado por picnometría). Como sabemos se utiliza el PE/DU para informar la concentración de solutos urinarios.

En el refractómetro la escala de PE/DU está basada en datos provenientes de orinas normales.

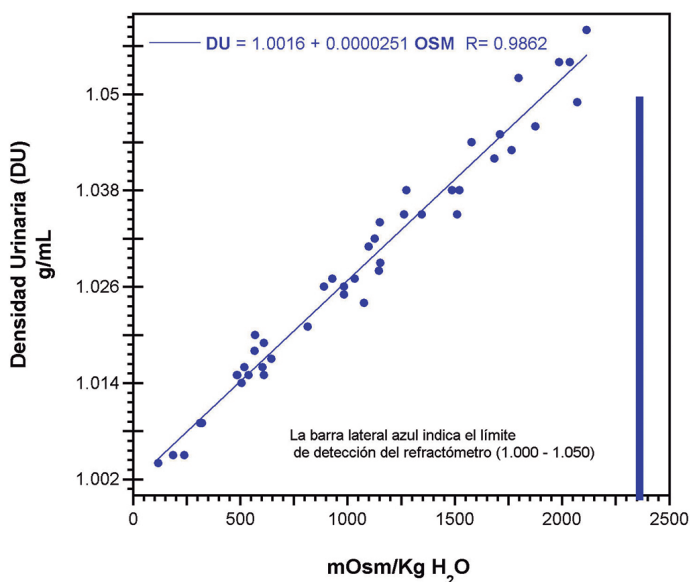
Hay ciertos solutos que alteran la relación entre refractividad y DU, por ejemplo la acetona que es más densa que el  $\text{H}_2\text{O}$  y por lo tanto disminuye la DU y sin embargo incrementa la refractividad. Wolf propuso informar la refracción de la orina pero no tuvo eco y no se adoptó en la práctica médica ni veterinaria.

### **Osmometría**

El método más exacto para medir la concentración de solutos urinarios es la osmometría (2). En el Anexo 1 se describe en más detalle la osmometría y su importancia en la estimación de las concentraciones de solutos urinarios y del plasma.

El índice de refracción puede utilizarse como un método de rutina para estimar la DU cuando no esté disponible la osmometría (4). En humanos hay una buena correlación entre osmolalidad de orina (OSM) e índice de refracción. Densidades urinarias de 1.001 y 1.030 se corresponden a OSM de 40 y 1200 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O respectivamente, sin embargo esta relación es alterada por la presencia en la orina de glucosa y proteínas. En la Figura 8, se muestra la correlación entre osmolalidad de la orina y DU por refractometría obtenida en muestras de caninos en nuestro laboratorio (27).

**Relación entre la densidad de la orina medidas por refractometría (DU) con la osmolalidad de la orina (mOsm/Kg H<sub>2</sub>O)**



**Figura 8.** Se muestra la relación entre las osmolalidades de orinas, determinadas por descenso crioscópico y las DU estimadas por refractometría

**Nota:** Esta gráfica fue obtenida analizando 44 muestras de orinas provenientes de perros sanos. En el caso de muestras que excedieron el límite de medición del instrumentos (PE> 1.050), las mismas fueron diluidas de acuerdo a lo expresado más abajo (Cálculos del PE de orinas muy concentradas).

**¿Qué hacer cuando nos encontramos con muestras cuya DU excedieron el límite de medición del instrumentos (DU>1.050)?**

**Cálculo de la DU de orinas muy concentradas (DU> 1.050) (30,39)**

Supongamos que la DU de una orina medido por refractometría nos da un valor fuera de escala (DU> 1.050), se debe proceder de la siguiente manera:

1. diluir 50  $\mu\text{L}$  de orina con 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada (dilución 1/2)
2. determinar la nueva DU de la dilución, Ej: 1.030
3. para calcular la DU de la dilución se debe multiplicar la porción decimal de la nueva lectura por la dilución:  $0.030 \times 2 = 0.060$ , luego la DU final será: 1.060

### **Estimación de la Osmolalidad de la orina a partir de la DU medida por refractometría**

Es posible hacer el cálculo aproximado de la OSM de la orina utilizando el dato obtenido por refractometría. En humanos la OSM y la DU están relacionadas por la siguiente relación (17,25):

$$1000 \times (DU - 1) / \text{OSM}_{\text{urinaria}} = 0.0318 \pm 0.0053$$

expresión que se aproxima a:  $\text{OSM}_{\text{urinaria}} = (DU - 1) \cdot 40.000$

Hendricks (14) ha publicado una fórmula obtenida de correlacionar datos de DU de orinas de caninos obtenidos por refractometría y estimada su OSM por descenso crioscópico.

$$\text{OSM}_{\text{urinaria}} (\text{mOsm/Kg H}_2\text{O}) = 36.000 \times (DU - 1)$$

número de muestras = 56,  $r = 0.99$ , para un rango de DU: 1.002 - 1.050

La forma simple de hacer el cálculo es multiplicar por 36 las dos últimas cifras de la DU

Ej:  $DU = 1.040$

$$\text{OSM}_{\text{urinaria}} = 36 \times 40 = 1.440 \text{ mOsm/Kg H}_2\text{O}$$

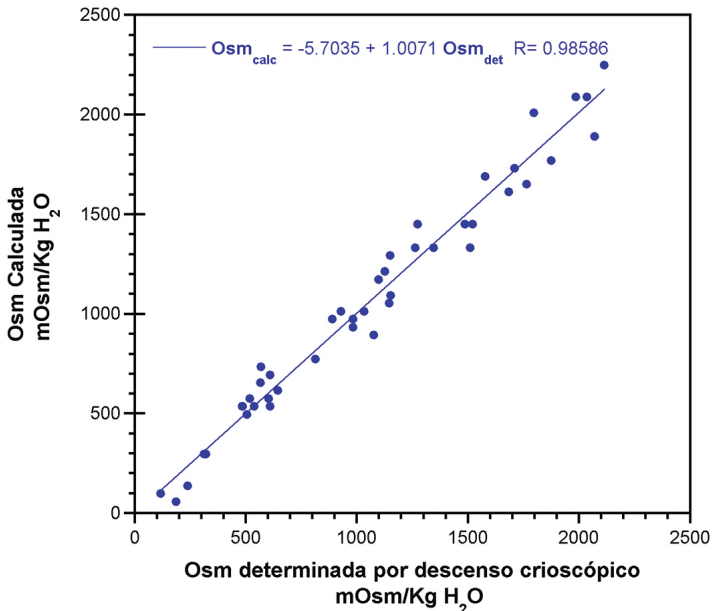
En nuestro laboratorio hemos obtenido una ecuación muy similar a la de Hendricks (14), en la Figura 8 se muestra la relación entre DU y OSM determinada experimentalmente en muestras de orina de caninos. En este caso la ecuación obtenida es:

$$\text{OSM}_{\text{urinaria}} = 39.840 \times (DU - 1.0016).$$

En la Figura 9, puede observarse la excelente correlación entre la OSM calculada a partir de la DU y la OSM determinada por descenso crioscópico obtenida a partir del análisis de 44 muestras de orina provenientes de caninos sanos.

Por otra parte, Galambos (8) ha informado que debe ser extremadamente cauteloso en predecir la OSM de la orina en base a la determinación de la DU por densimetría debido al amplio intervalo de confianza de la medición, la temperatura de la muestra, etc.

**Relación entre la osmolalidad calculada a partir de la Densidad de la orina versus la osmolalidad determinada por descenso crioscópico**



**Figura 9.** Se muestra la relación entre la osmolalidad de orinas, obtenida por descenso crioscópico y la osmolalidad calculada a partir de la DU estimada por refractometría.

**Nota:** Esta gráfica fue obtenida analizando 44 muestras de orinas provenientes de perros sanos.

En el caso de muestras que excedieron el límite de medición del instrumentos ( $PE > 1.050$ ), las mismas fueron diluidas de acuerdo a lo expresado en el párrafo anterior (Cálculos del PE de orinas muy concentradas).

**Efecto de los constituyentes anormales de la orina sobre la determinación refractométrica de la DU:** Correcciones a realizar en la DU debida a la presencia de altas concentraciones de Glucosa o proteínas en orina

De las evidencias aquí presentadas, sabemos:

- La DU y al OSM urinaria se correlacionan positivamente en orinas normales.
- En presencia de Glucosa o proteínas se producen desviaciones de la DU, entonces la DU no representa la OSM real de la orina
- ¿Qué correcciones deberíamos entonces realizar para eliminar el aporte de la glucosa o proteínas en el valor de DU medido y de esta manera obtener el valor real y representativo de la OSM de la Orina?

Cuando la muestra de orina contiene glucosa o proteínas (29), ambas son sustancias de un peso molecular considerable que incrementan la DU y no están relacionadas

a la capacidad de concentración renal. Por estas razones para obtener un dato más exacto de la capacidad de concentración renal es necesario sustraer a la DU medida la contribución de estas sustancias. Sabemos que 1 g/dL de proteína en orina incrementa la DU en 0.003 unidades y 1 g/dL de glucosa lo hace en 0.004 unidades (3).

Ejemplo: analizamos una muestra de orina cuya DU = 1.040 y contiene además 1 g/dL de proteína y 1 g/dL de glucosa.

DU = 1.040 - 0.003 (aporte de proteína) = 1.037 - 0.004 (aporte de glucosa) = 1.033  
DU corregida.

En la Figura 10 se presenta el esquema completo del análisis de orina y la determinación de la DU por refractometría en los casos de orinas normales y con la presencia de glucosa o proteínas.

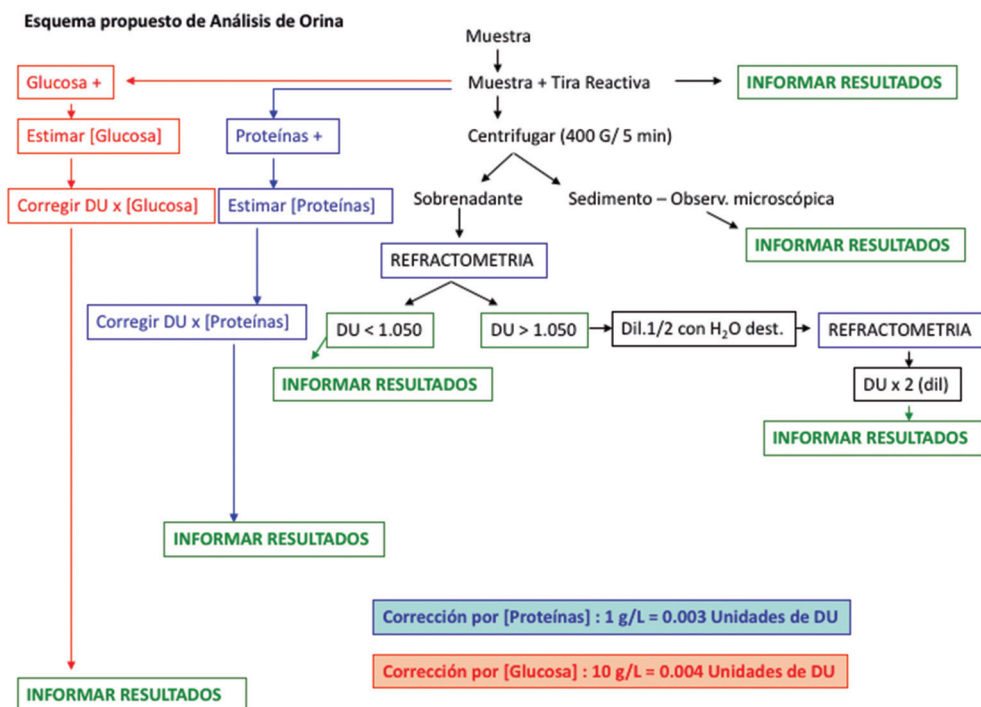


Figura 10. Esquema completo del análisis de orina por refractometría (27)

### El problema de la refractividad de la orina de felinos

Rubini y col. (28) en 1956, basados en el análisis de 190 muestras de orina humana,

22 de felinos y 21 de caninos, en las que analizaron el índice de refracción, la DU y el peso por desecación, establecieron que la orina felina se comportó de manera similar a la humana y canina respecto del análisis refractométrico, es decir hubo un incremento lineal del índice de refracción con el incremento de sólidos totales en las muestras. Sin embargo los resultados de la picnometría mostraron que la DU de felinos era más baja que la esperada comparada con las de humanos y caninos. Un aspecto importante de ese estudio era que las 22 muestras de felinos eran más concentradas que las de humanos y caninos, por lo general las DU de felinos son  $>1.030$ , en cambio para humanos  $DU > 1.020$  (26) son consideradas concentradas.

El uso de la escala para DU de humanos/caninos en los refractómetros clínicos para la determinación de DU en orina de felinos da valores aumentados falsos, especialmente para muestras con mayor concentración de solutos. Hay algunas marcas de refractómetros que incluyen una escala separada para orina de felinos, esta escala está basada en los trabajos de Rubini (28).

Basados en que la orina de felinos tiene una mayor refracción que la de humanos y caninos cuando se utiliza un instrumento con la escala para humanos/caninos y por lo tanto sobreestima los valores de DU, se ha sugerido un factor de conversión (9) para corregir los datos de orinas de felinos:

$$DU_{\text{felinos}} = (0.846 \times DU) + 0.154$$

Tvedten y col (36) (en un estudio con un bajo número de muestras) han reafirmado las observaciones de Rubini (28) y demostrado que los refractómetros con escala para DU de felinos dan resultados con valores más bajos comparados con la refractometría y métodos de referencia. Se ha sugerido (9) que el alto contenido de proteínas en la dieta de felinos podría estar asociado al fenómeno de refractividad descripto.

En la actualidad, existen aplicaciones para teléfonos celulares que permiten hacer esta corrección rápidamente (app USG converter para smartphones).

### **Valores de DU de orinas de animales sanos**

Los DU de animales normales varían de acuerdo a la ingesta de agua y al estado de hidratación (40), se sugieren los siguientes valores de DU considerados normales:

- caninos (1.015 - 1.045)
- felinos (1.035 - 1.065).

## CAPÍTULO 4

### Información que podemos obtener con el refractómetro de uso clínico

Se adjunta la dirección web adónde obtener las tablas provistas con el refractómetro Reichert (Mod. 1310400A), las mismas son de gran utilidad para la obtención de datos adicionales (37). Con el refractómetro podemos obtener tres lecturas, una para la escala de **proteínas (g/dL)**, otra para **índice de refracción (n)** o para la **refractividad,  $r = 1000 \cdot (n_s - n_o)$**  y la tercera para la **DU de orina (UG)**.

Con estos datos podemos obtener otros parámetros por interpolación en la tablas adjuntas, las abreviaturas de los parámetros se expresan en inglés en las tablas.

### Refractometría de Plasma o suero (temperatura 20 °C)

- **Sólidos totales (TS)** (g/100 mL de suero o plasma) (temperatura 20 °C), se expresa como  $C_{TS}$  (Concentración de TS). Ejemplo: Concentración de proteínas 7.0 g/dL, en tabla  $C_{TS}$ : 8.6 g/100mL.
- **Sólidos totales en % en peso (TS %)**(g/100g suero). Con la lectura de proteínas obtenida con el refractómetro buscamos en la tabla la columna  $C_{\%}$  (Concentración de  $ST_{\%}$ ). Ejemplo: Concentración de proteínas 5.7 g/dL, en tabla  $C_{\%}$ : 7%.
- **H<sub>2</sub>O % en peso** (g/100g de suero). Calcular  $100 - TS \%$ , Ejemplo:  $100 - 7 \% = 93$ ,  $g_{H_2O}/100g$  de suero.
- **Concentración de H<sub>2</sub>O ( $C_w$ )**( $g_{H_2O}/100$  mL de suero). Ejemplo: Concentración de proteínas 5.7 g/dL, en tabla  $C_w$ : 94.9,  $g_{H_2O}/100$  mL suero.
- **Densidad del suero o plasma ( $D_{20}/D_{20}$ )**. Con la lectura de proteínas obtenida con el refractómetro buscamos en la tabla la columna  $D_{20}/D_{20}$ . Ej: Concentración de proteínas 5.7 g/dL, en tabla  $D_{20}/D_{20}$ : 1.0219

- **Concentración de Sólidos totales relativos al H<sub>2</sub>O** (g TS/100 g H<sub>2</sub>O). Se calcula como  $(C_{TS} \div C_w) \times 10^2 = \text{g de TS/ 100 g H}_2\text{O}$ . Concentración de proteínas 5.7 g/dL en tabla 7.5 g de TS/ 100 g H<sub>2</sub>O.

### Refractometría de orina (temperatura 20 °C)

**Densidad de orina.** Lectura directa en escala UG.

- **Sólidos totales en % en peso (TS %)**(g/100g orina). Con la lectura de DU obtenida con el refractómetro buscamos en la tabla la columna C<sub>%</sub> (Concentración de TS%). Ejemplo: PE 1.032, en tabla TS<sub>%</sub>: 7.7%.

- **H<sub>2</sub>O % en peso** (g/100g de orina). Calcular 100 - TS %, Ejemplo: 100 - 7.7 % = 92.3, g<sub>H<sub>2</sub>O</sub>/100g de suero.

- **Sólidos totales (TS)** (g/100 mL de orina). Con la lectura de DU obtenida con el refractómetro buscamos en la tabla la columna C<sub>TS</sub> (Concentración de TS). Ejemplo: PE 1.032, en tabla C<sub>TS</sub>: 7.9 g/100mL de orina.

- **Concentración de H<sub>2</sub>O (C<sub>w</sub>)**(g<sub>H<sub>2</sub>O</sub> /100 mL de orina). Ejemplo: PE 1.032, en tabla C<sub>w</sub>: 95 g<sub>H<sub>2</sub>O</sub>/100 mL orina.

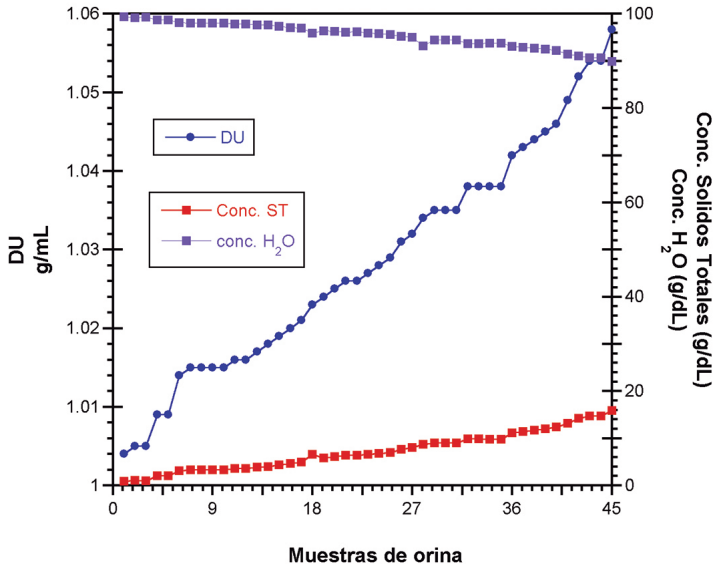
**Concentración de Sólidos totales relativos al H<sub>2</sub>O** (g TS/100 g H<sub>2</sub>O). Se calcula como  $(C_{TS} \div C_w) \times 10^2 = \text{g de TS/ 100 g H}_2\text{O}$ . DU 1.032, en tabla 8.3 g de TS/ 100 g H<sub>2</sub>O.

En la Figura 11 (página siguiente) se muestra la relación entre la DU obtenida por refractometría de 44 orinas de caninos sanos y la concentración de sólidos totales (ST) y concentración de H<sub>2</sub>O calculada utilizando las tablas citadas (37).

### Índice de refracción (n) de soluciones de solutos conocidos (temperatura 20 °C)

Con la lectura directa de n obtenida con el refractómetro buscamos en la tabla la columna cuyo parámetro necesitamos obtener. Esto se puede utilizar para determinar las propiedades concentrativas como % en peso, concentración, etc. para sustancias varias. En el caso de necesitar determinar la concentración de sustancias mediante el n, es necesario consultar las tablas publicadas en el manual de Wolf (41). De la misma manera es posible usar el refractómetro para controlar preparaciones de medicamentos (13). Reichert ha publicado una tabla para uso con su refractómetro veterinario (38).

Densidad urinaria (DU), concentración de Sólidos Totales (ST) y concentración de Agua (CW) en muestras de orinas caninas



**Figura 11.** Se muestra la relación entre la DU estimada por refractometría y la concentración de sólidos totales (ST) y la concentración de H<sub>2</sub>O (CH<sub>2</sub>O) en orinas

**Nota:** Esta gráfica fue obtenida utilizando orinas de 44 perros sanos.

## CAPÍTULO 5

### **Selección y mantenimiento de refractómetros**

Es indispensable que el refractómetro tenga compensación automática de temperatura, sino el dato obtenido no es referenciable a otras mediciones realizadas en otros laboratorios o a tablas publicadas.

Los refractómetros para uso clínico disponibles en el mercado pueden ser refractómetros de mano, de mesa, ambos pueden obtenerse también en versiones digitales. Los primeros son más económicos y puede encontrarse una enorme variedad de marcas, nuestro criterio de selección se centra en la claridad y graduación del retículo del instrumento que se va a adquirir, por eso es importante que quien lo vaya a operar lo pruebe. Ejemplo, en la Figura 4 se muestran dos tipos de retículos mostrando el primero una graduación de la escala UG/DU mucho más fácil de leer que la segunda. También es importante que el instrumento incluya el índice de refracción, lo que da versatilidad al instrumento y nos permite determinar otros parámetros (ver caso determinación de proteínas en fluidos corporales, etc.).

Para el caso de determinación de la DU de orina de felinos hay dos marcas que ofrecen instrumentos dedicado a esta determinación: Leica Microsystem y Misco Corp.

El mantenimiento de refractómetros es muy simple, hay que limpiar el prisma con agua destilada y un papel tisú después de cada medición. Una vez finalizado el trabajo diario, colocar una gota de solución con detergente de laboratorio en el prisma y limpiarla con papel tisú, posteriormente hacer dos o tres lavados con agua destilada.

Los refractómetros digitales de mano son de muy fácil mantenimiento, requieren de la calibración diaria con agua destilada y del lavado entre muestra y muestra para eliminar el carryover y secado con papel tisú. Por lo general la necesidad del cambio de batería es indicado en el panel de lectura.

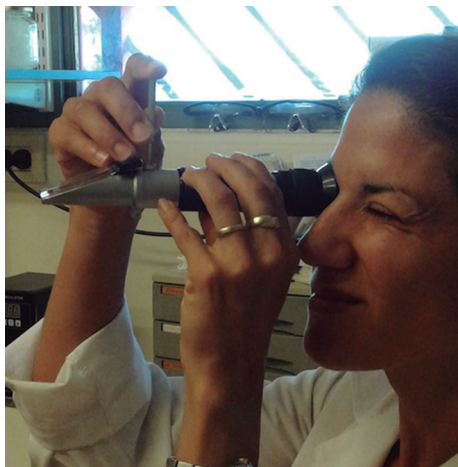
### Control de calidad para los refractómetros de mano

Antes de utilizarlo cada día hay que chequear con agua destilada el 1.000 de **DU** o 1.3330 de **n** y si está desplazado ajustarlo con el tornillo superior (previamente hay que retirar la protección del tornillo) tal como se muestra en la Figura 12. También el instrumento puede validarse, utilizando soluciones de concentraciones conocidas disponibles en el mercado. Otros calibradores conocidos que pueden prepararse en el laboratorio son:

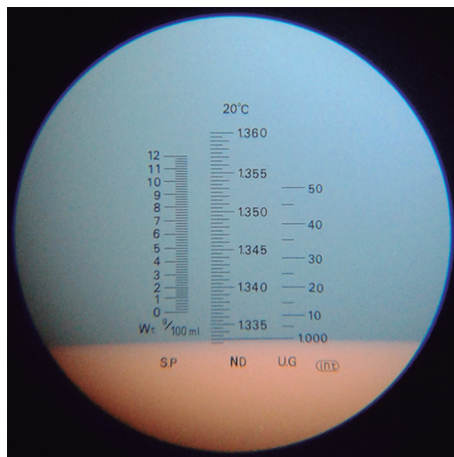
5 % NaCl -  $(1.022 \pm 0.001)$ .

El NaCl debe ser previamente desecado por calentamiento a 120-130 °C durante 3-4 hs.

9 % Sucrosa -  $(1.034 \pm 0.001)$



**Figura 12A.** Calibración del refractómetro con agua destilada



**Figura 12B.** Vista del retículo

En el caso de refractómetros digitales de mano, el procedimiento de calibración es automático al encender el instrumento.

**No utilizar los sueros patrones de proteínas provistos para análisis clínicos** porque tienen solutos conservantes en distintas concentraciones respecto del suero que normalmente se utiliza para calibrar la escala de proteínas del instrumento, por ello los valores refractométricos obtenidos con estos estándares no coincidirán con las concentraciones de proteínas enunciadas en los estándares.

## **ANEXO: OSMOMETRÍA**

### **Definiciones**

La osmometría puede definirse como la medición directa de la concentración molar de los solutos totales en un litro de una solución acuosa. También podemos decir que es la medición directa de la concentración molal de los solutos contenidos en 1 Kg H<sub>2</sub>O.

### **Osmolalidad de soluciones puras**

La osmolalidad de una solución acuosa es la suma del número de moles de todos los iones disueltos y moléculas no disociadas en 1 Kg H<sub>2</sub>O. Los datos se expresan como osmoles/Kg H<sub>2</sub>O (Osm/Kg H<sub>2</sub>O) o miliosmoles/Kg H<sub>2</sub>O (mOsm/Kg H<sub>2</sub>O).

Una solución que contiene 1 Osm/Kg H<sub>2</sub>O (o 1.000 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O) tiene un punto de congelamiento de -1.86 °C, por lo que la Osm de soluciones puede determinarse midiendo la depresión del punto de congelamiento de dichas soluciones.

Por ejemplo, si disolvemos 1 mol de glucosa (180 g) en 1 Kg H<sub>2</sub>O, tendremos una solución que contiene 1 osmol/Kg H<sub>2</sub>O porque la glucosa no se disocia en iones.

Buscando en un manual de química física el punto de congelamiento de un mol de glucosa encontramos que es muy próximo a -1.858 °C, veremos que es ligeramente superior a -1.858 °C debido a la hidratación de la molécula de glucosa.

Si disolvemos 1 mol de NaCl (58.45 g) en un Kg H<sub>2</sub>O, esperamos que esta solución tenga un tenor de 2 Osm/Kg H<sub>2</sub>O, ya que la molécula se disocia en dos iones (valor que observamos ligeramente menor debido a que el NaCl no se disocia totalmente).

Para corregir estas desviaciones del comportamiento ideal, se introdujo el término coeficiente osmótico ( $\theta$ ). Por ejemplo el  $\theta$  del NaCl es función de la concentración del mismo y varía entre 0.91 y 0.95 para concentraciones de 0.05 a 1.1 molal. Por lo general se utiliza un  $\theta$  de 0.93 en los análisis clínicos.

Entonces si 1 osmol disminuye el punto de congelamiento del agua por  $-1.858\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 1 osmol es un mol de partículas osmóticamente activas en un Kg  $\text{H}_2\text{O}$ :

$$1 \text{ Osm} = \theta \cdot n \cdot c \quad \text{siendo}$$

$\theta$  = coeficiente osmótico,  $n$  = número de partículas resultantes de la disociación de cada molécula en solución y  $c$  = concentración de cada molécula en mol/Kg  $\text{H}_2\text{O}$ .

Consideremos el siguiente ejemplo:

- disolvemos 29 g de NaCl en 1 Kg  $\text{H}_2\text{O}$ , siendo  $\theta = 0.93$
- $n = 2$  (dos partículas disueltas por molécula; 1  $\text{Na}^+$  y 1  $\text{Cl}^-$ )
- si disolvemos 29 g de NaCl en 1 Kg  $\text{H}_2\text{O}$  y el Peso molecular del NaCl = 58, la  $c = 0.5 \text{ mol/Kg } \text{H}_2\text{O}$ ,

Entonces la

$$\text{Osm} = \theta \cdot n \cdot c = 0.93 \times 2 \times 0.5 = 0.93 \text{ Osmol/Kg } \text{H}_2\text{O} = 930 \text{ mOsmol/Kg } \text{H}_2\text{O}$$

La depresión del punto de congelación será:

$$\text{Depresión Punto Congelación } (^{\circ}\text{C}) = 0.93 \text{ Osmol/Kg } \text{H}_2\text{O} \times -1.858\text{ }^{\circ}\text{C/Osmol/Kg } \text{H}_2\text{O} = -1.728\text{ }^{\circ}\text{C}$$

De otra forma, si tenemos una Depresión del Punto de congelación (PC) =  $-0.278\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ¿Cuál será la osmolalidad de esa solución?

$$-0.278\text{ }^{\circ}\text{C} \div (-1.858\text{ }^{\circ}\text{C/Osmol/Kg } \text{H}_2\text{O}) = 0.150 \text{ Osmol/Kg } \text{H}_2\text{O} = 150 \text{ mOsmol/Kg } \text{H}_2\text{O}$$

### **Osmolalidad y Osmolaridad**

Hemos establecido que la Osmolalidad expresa la suma del número de moles de todos los iones disueltos y moléculas no disociadas en 1 Kg  $\text{H}_2\text{O}$ . Es decir, se pesa 1 Kg  $\text{H}_2\text{O}$  y se le añaden los solutos.

La Osmolaridad expresa la suma del número de moles de todos los iones disueltos y moléculas no disociadas en 1 Litro de solución. Aquí se añaden los solutos al  $\text{H}_2\text{O}$  y la solución se completa a 1 L.

#### **• ¿Por qué la Osmolalidad se expresa por 1 Kg $\text{H}_2\text{O}$ y no por 1 L de solución?**

Sabemos que la solubilidad de sustancias en agua depende de la temperatura, si referimos nuestros solutos como disueltos en 1Kg  $\text{H}_2\text{O}$ , hacemos las mediciones independientes de la temperatura.

- **¿Cuál es entonces la diferencia entre Osmolalidad y Osmolaridad en los líquidos biológicos?**

En la osmolaridad, los solutos están disueltos en 1 Litro de solución por lo tanto estarán ligeramente más concentrados que en la solución osmolal, además de su dependencia de la temperatura.

Recordar entonces que una solución 1 Osmolar será ligeramente más concentrada que una 1 Osmolal.

Para calibrar los osmómetros se utilizan soluciones Osmolales, por ejemplo de 300, 500, 800, 1000 y 2000 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O, por ello los valores obtenidos se expresan en dichas unidades.

- **¿Cómo se determina la Osmolalidad de líquidos biológicos?**

El método más utilizado es el del descenso crioscópico, que consiste en determinar el punto de congelamiento del líquido biológico cuya OSM queremos determinar, para luego compararlo con el punto de congelamiento de una solución standard de OSM conocida. Por ejemplo para suero se utiliza un standard de 300 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O, para orinas se utilizan standards cuyas OSM oscilan entre 600 a 2000 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O. Los instrumentos que se utilizan se denominan osmómetros y funcionan de la siguiente manera:

1. se estima el punto de congelamiento del agua destilada o 0 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O.
2. se calibra el instrumento con un standard de 300 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O
3. se determina el punto de congelamiento del líquido biológico es cuestión.

El laboratorista no ve en el instrumento los puntos de congelamiento, sino que el mismo directamente registra los valores en mOsm/Kg H<sub>2</sub>O. Por ejemplo, para el osmómetro Osmomat Gonotec 030 (Figura 13), se pipetea la muestra (50 µL) en un pequeño tubo tipo Eppendorf y se inserta en el equipo en un soporte especialmente diseñado que contiene un termistor que monitorea continuamente la temperatura de la muestra durante el proceso de enfriamiento de la misma. Al activar la medición, el tubo comienza a ser enfriado por un sistema Peltier, en el caso del osmómetro Gonotec, la temperatura de la muestra desciende hasta -7 °C, momento en el cual un dispositivo siembra automáticamente un cristal de hielo en la muestra iniciando así la cristalización del agua de la muestra, el termistor registra la liberación de calor producida por la formación del hielo en la muestra, ello hace que la temperatura se incremente espontáneamente y luego alcance su punto de congelamiento.

Si la muestra consiste en agua pura se obtendrá el punto de congelamiento correspondiente a la misma y a una OSM de 0 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O. Para los estándares los puntos de congelamiento serán más bajos de acuerdo al incremento de la concentración de solutos de los mismos. El instrumento realizará la interpolación correspondiente cuando se determine el punto de congelamiento del líquido biológico en análisis.



**Figura 13.** Osmómetro Osmomat 030, se puede observar el tubo conteniendo la muestra insertado en el portamuestras que contiene el termistor que monitorea la temperatura del proceso de enfriamiento. Para activar la medición, el porta muestras se inserta en el sistema de enfriamiento (SE) mediante un aditamento dispuesto a tal fin.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bennett AD, McKnight GE, Dodkin SJ, Simpson KE, Schwartz AM, Gunn-Moore DA. Comparison of digital and optical hand-held refractometers for the measurement of feline urine specific gravity. *J Feline Med Surg.* (2011) 13:152-4.
2. Bovee KC. Urine osmolarity as a definitive indicator of renal concentrating capacity. *J Am Vet Med Assoc.*(1969) 155:30-5.
3. Chadha V, Garg U, Alon US. Measurement of urinary concentration: a critical appraisal of methodologies. *Pediatr. Nephrol.*(2001) 16:374-82.
4. Dossin O, Germain C, Braun JP. Comparison of the techniques of evaluation of urine dilution/concentration in the dog. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* (2003) 50:322-5.
5. Dubin S, Hunt P. Effect of anticoagulants and glucose on refractometric estimation of protein in canine and rabbit plasma. *Lab Anim Sci.* (1978) 28:541-544.
6. Duncan JR, Prasse KW, Mahaffey EA. *Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology.* 3<sup>rd</sup> ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press; (1994), p. 114-115.
7. Estepa JC, Lopez I, Mayer-Valor R, Rodriguez M, Aguilera-Tejero E. The influence of anticoagulants on the measurement of total protein concentration in equine peritoneal fluid. *Res Vet Sci.* (2006)80 :5-DOI: 10.1016/j.rvsc.2005.03.007.
8. Galambos, JT, et al. Specific Gravity Determination: Fact or Fancy?, *N Eng J Med,*(1964) 270:506-508.
9. George JW. The usefulness and limitations of hand-held refractometers in veterinary laboratory medicine: an historical and technical review. *Vet Clin Pathol*(2001) 30:201-210.
10. Gupta A, Stockham SL. Refractometric total protein concentrations in icteric serum from dogs. *J Am Vet Med Assoc.* (2014) 244:63-67.
11. George JW, O'Neill SL. Comparison of refractometer and biuret methods for total protein measurement in body cavity fluids. *Vet Clin Pathol*(2001) 30:16-18.
12. George JW. Questions evaluation of refractometer. *Am J Vet Res* (2001) 62:648-649.
13. Hendrickx S, Verón AM, Van Schepdael A, Adams E. Applicability of refractometry for fast routine checking of hospital preparations. *Eur J Pharm Sci.* (2016) 30:13-19.
14. Hendriks HJ, de Bruijne JJ, van den Brom WE. The clinical refractometer: a useful tool for the determination of specific gravity and osmolality in canine urine. *Tijdschr Dier-geneeskd.* (1978) 103:1065-8.

15. Hunsaker JJH, Wyness SP, Snow TM, Genzen JR. Clinical performance evaluation of total protein measurement by digital refractometry and characterization of non-protein solute interferences, *Practical Lab Med* (2016) 6:14-24.
16. Legendre, K. P., Leissingner, M., Le Donne, V., Grasperge, B. J. and Gaunt, S. D. The effect of urea on refractometric total protein measurement in dogs and cats with azotemia. *Vet Clin Pathol*, (2017) 46:138-142. doi:10.1111/vcp.12464.
17. Lentner C. Units of measurements, *Body Fluids, Composition of the Body, Nutrition*. Ciba-Geigy, Basel (1984) p. 45.
18. Light RW. Falsely high refractometric readings for the specific gravity of pleural fluid, (1979) *Chest*. 76:300-301.
19. Lumeij JT & de Bruijne JJ. Evaluation of the refractometric method for the determination of total protein in avian plasma or serum. *Avian Pathology*(1985) 14:441-444, DOI: 10.1080/03079458508436245.
20. Lumeij JT and de Bruijne JJ. Blood chemistry reference values in racing pigeons. (*Columba livia domestica*). *Avian Pathology* (1985) 14: 401-408.
21. Matthews S, Dart AJ, Reid SW, Dowling BA, Hodgson DR. Predictive values, sensitivity and specificity of abdominal fluid variables in determining the need for surgery in horses with an acute abdominal crisis. *Aust Vet J.*(2002) 80:132-6.
22. McSherry BJ, Al-Baker J. Comparison of total serum protein determined by T/S meter and biuret technique. *Bull Amer Soc Vet Clin Path.* (1976) 3:4-12.
23. Miyagawa Y, Tominaga Y, Toda N, Takemura N. Development of correction formulas for canine and feline urine specific gravity measured using a Japanese refractometer. *J Vet Med Sci.*(2011) 73:679-81.
24. Moore N, Van Slyke D. The relationships between plasma specific gravity, plasma protein content, and edema in nephritis. *J. Clin. Investig.* (1930) 8:337-355.
25. Pradella M, Dorizzi RM, Rigolin F. Relative density of urine: methods and clinical significance. *Crit Rev Clin Lab Sci.* (1988) 26:195-242.
26. Price JW, Miller M, Haymen JM. The relation of specific gravity to composition and total solids in normal human urine. *J Clin Invest* (1940) 19:537-553.
27. Rodriguez JV, Colla C, Gines MB, Schröder G. Determinación de la concentración de solutos en orinas de pacientes caninos: comparación de osmometría versus densidad urinaria (refractometría y tiras reactivas). *Analecta Veterinaria* (2018) 38:45-49.
28. Rubini ME, Wolf AV. Refractometric determination of total solids and water of serum and urine. *J Biol Chem.* (1957) 225:869-76.
29. Stranger SK, Di Lorenzo MS. *Urinalysis and body fluids* 5th Ed. ISBN 978-0-8036-1697-4. FA Davis Co, Philadelphia, USA. (2008), p. 46-48.
30. Sink CA, Weinstein NM. (2012). *Practical Veterinary Urinalysis*. p. 23. Wiley-Blackwell. ISBN: 978-0-470-95824-7.
31. Stockham SL, Scott MA. (2008). Urinary system. In *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*, 2nd ed. Stockham SL, Scott MA, eds., pp. 415-94. Ames, IA: Blackwell Publishing.
32. Saetun P, Semangoen T, Thongboonkerd V. Characterizations of urinary sediments precipitated after freezing and their effects on urinary protein and chemical analyses. *Am J Physiol Renal Physiol.* (2009) 296:F1346-54.

33. Stoklosa MJ, Ansel HC. *Pharmaceutical Calculations*, 8 Ed. Lea & Fabinger, (1986) p. 113.
34. Sutton RH. The refractometric determination of the total protein concentration in some animal plasmas. *N Z Vet J* (1976) 24:141-148.
35. Sutton RH. The estimation of fibrinogen levels in animal plasmas by a simple refractometric method. A comparison with a biuret method. *Res Vet Sci.* (1977) 22:384-385.
36. Tvedten HW, Ouchterlony H, Lilliehöök IE. Comparison of specific gravity analysis of fe-line and canine urine, using five refractometers, to pycnometric analysis and total solids by drying. *N Z Vet J.* (2015) 63:254-9.
37. [http://www.reichertai.com/clientuploads/directory/download\\_pdfs/Goldberg%20TS%20Meter%20User%20Guide.pdf](http://www.reichertai.com/clientuploads/directory/download_pdfs/Goldberg%20TS%20Meter%20User%20Guide.pdf)
38. [http://www.reichertai.com/clientuploads/directory/download\\_pdfs/Reichert%20VET%20360%20User%20Guide.pdf](http://www.reichertai.com/clientuploads/directory/download_pdfs/Reichert%20VET%20360%20User%20Guide.pdf)
39. Watson ADJ. Urine specific gravity in practice. *Aust Vet J* (1998) 76(6):392-98.
40. Wolf AV, Fuller JB, Goldman EJ, Mahony TD. New refractometric methods for the determination of total proteins in serum and in urine. *Clin Chem.* (1962) 8:158-65.
41. Wolf AV, Brown MG, Prentis PG. Concentrative properties of aqueous solutions: conversion tables. In: Weast RC, Ed. *The CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 70th ed. Boca Raton, Fla: CRC Press; (1990) pp. D252-D253.
42. Wolf AV. *Aqueous solutions and body fluids. Their concentrative properties and conversion tables.* Hoeber Medical Division, Harper & Row Publishers, New York; (1966).
43. Wyness S.P., Hunsaker J.J.H, Snow T.M., Genzen J.R. Evaluation and analytical validation of a handheld digital refractometer for urine specific gravity measurement, *Practical Lab Med*, (2016) 5:65-74.

**El uso del refractómetro en el Laboratorio Clínico Veterinario**  
**MANUAL**

---

Procesado gráfico integral

**UNR EDITORA**

EDITORIAL DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

Secretaría de Extensión Universitaria

Urquiza 2050 - S2000AOB / Rosario - República Argentina

[www.unreditora.unr.edu.ar](http://www.unreditora.unr.edu.ar) / [editora@sede.unr.edu.ar](mailto:editora@sede.unr.edu.ar)

Año 2018