

## RECOMENDACIONES PARA TOMAR MUESTRAS DE AMONIO SANGUÍNEO

El amonio es un producto tóxico del metabolismo nitrogenado. Su acumulación en sangre y secundariamente en sistema nervioso central es responsable, aunque no de forma exclusiva, del desarrollo de la encefalopatía hepática y en último extremo del coma hepático.

La medida del amonio se utiliza en la práctica clínica para el diagnóstico, monitorización y pronóstico de las enfermedades relacionadas con hiperamonemia. La exactitud de la determinación del amonio depende en gran medida tanto de factores preanalíticos como de la metodología utilizada.

Las indicaciones más frecuentes para la medida de las concentraciones sanguíneas de amonio son el diagnóstico y seguimiento de patologías relacionadas con el daño hepático grave, determinados errores congénitos del metabolismo, daños provocados por ciertos tratamientos y en ocasiones puede ayudar a conocer a qué se deben los cambios en la conducta o la conciencia de un paciente.

### Factores preanalíticos

#### 1. Ligados al paciente:

La edad: Las concentraciones de amonio son de cuatro a ocho veces más altos en neonatos y de dos a tres veces mayores en niños menores de tres años. A partir de esa edad son similares a los del adulto.

El tabaco: Se ha comprobado que las concentraciones de amonio se elevan aproximadamente 10 µmol/L después de un cigarrillo. Se recomienda que el paciente permanezca sin fumar al menos 12 horas antes de la extracción .

El ejercicio: Los valores fisiológicos de amonio se incrementan más de tres veces tras el ejercicio. Este incremento es superior en hombres que en mujeres. En un reciente estudio se afirma, además, que en el ejercicio prolongado la entrada y la acumulación de amonio en el cerebro pueden provocar fatiga, ya que afecta al metabolismo neurotransmisor .

**Tratamientos con determinados fármacos:** El uso de algunos fármacos, como los barbitúricos, la acetazolamida o los diuréticos, puede incrementar las concentraciones de amonio, por lo que es importante saber si un paciente los está tomando.

## 2. Ligados a la muestra

### Tipo de muestra

En personas sin daño hepático aparente la concentración de amonio en sangre venosa es similar a la arterial. No obstante, hay que considerar que la isquemia inducida por el torniquete y la contracción muscular pueden ser causa de liberación de amonio en sangre venosa lo que puede provocar concentraciones falsamente elevadas. Por ello, se debe prestar especial atención al tiempo de torniquete, que debe ser mínimo, y a la contracción muscular, pues hay que evitar apretar y relajar el puño durante la extracción dado que pueden incrementarse las concentraciones de amonio.

La concentración de amonio en sangre venosa reflejará no sólo la eliminación a nivel hepático sino también el aclarado por músculos, riñones y cerebro. En consecuencia la concentración de amonio en sangre venosa será siempre menor que en sangre arterial. La medida de amonio en sangre arterial, salvo graves inconvenientes, parece más lógica y preferible que en sangre venosa.

A pesar de esto, en recientes publicaciones se señala que la medida de amonio en sangre venosa es tan útil en la práctica clínica como la medida en sangre arterial.

La muestra de suero no se recomienda para la determinación de las concentraciones sanguíneas de amonio. Para la obtención de plasma, los anticoagulantes de elección para la determinación cuantitativa de amonio son el EDTA y la heparina libre de amonio.

No obstante, en algunos trabajos recientes, en los que se utiliza el método enzimático con glutamato deshidrogenasa, los resultados obtenidos comparando ambos anticoagulantes señalan que el EDTA es el único anticoagulante aceptable. Esta afirmación se basa en que, en las muestras heparinizadas se obtuvieron resultados con concentraciones más bajas e incluso resultados falsos negativos, frente a las que contenían EDTA.

Para evitar este tipo de problemas analíticos es conveniente utilizar el anticoagulante que se señala expresamente en la metodología elegida.

### 3. Tratamiento de la muestra

Como el amonio es un producto del metabolismo celular, se pueden presentar falsos positivos debido a liberación de amonio de los eritrocitos y por desaminación de aminoácidos plasmáticos. La concentración plasmática de amonio también se ve afectada por la técnica de punción venosa y la temperatura de la muestra. El amonio es estable durante al menos de 15 min a 4°C.

Por lo anterior, es necesario tener en cuenta las siguientes recomendaciones para la toma de la muestra:

- A) Una vez obtenida la muestra introducirla inmediatamente en hielo y ser separada entre los 15 minutos seguidos a la recolección. Se ha demostrado que la velocidad de aumento de amonio sanguíneo es de aproximadamente 0,017 ug/mL de sangre/minuto a 25°C. Si el ensayo no se realiza de inmediato se debe congelar el plasma a -70 ° C. Además, la sangre capilar no se debe utilizar porque incurre en un mayor riesgo de hemólisis y daño tisular que podría dar lugar a falsas elevaciones de amonio
- B) El amonio se incrementa como consecuencia de la continuidad del metabolismo celular in vitro, aproximadamente el 20% al cabo de una hora y casi el 100% al cabo de dos, aunque este incremento es mucho mayor cuando hay enfermedad hepática por la elevada actividad de la GGT (36). Por lo tanto, la muestra mantenida en hielo se debe enviar inmediatamente al laboratorio.
- C) Es importante conservar la muestra en el recipiente tapado (tubo con tapón) hasta el momento de realizar la determinación.
- D) Tan pronto como la muestra llegue al laboratorio se procederá a su centrifugación, preferiblemente en centrífuga refrigerada. A continuación se separará el plasma, que es estable de dos a tres horas a 2°-4° C y 24 horas si se mantiene a -18° C (2). El empleo de hielo en el transporte de la muestra, la inmediata centrifugación y la rápida separación del plasma son esenciales para garantizar la exactitud de los resultados obtenidos en la determinación de amonio.

#### 4. Presencia de hemólisis

Aunque la presencia de hemólisis podría ser motivo de rechazo de la muestra dado que los eritrocitos poseen concentraciones de amonio 2,8 veces superiores a las del plasma, algunas metodologías señalan expresamente que se podría realizar la determinación de amonio siempre que el grado de hemólisis no sobrepasase una determinada concentración de hemoglobina libre. Es por tanto muy importante considerar en cada caso las limitaciones analíticas de la metodología utilizada.

#### 5. Métodos analíticos

Los métodos utilizados para la medida del amonio en sangre pueden clasificarse en:

- Métodos de difusión

Se basan en el principio de liberación del amoniaco de la muestra como base libre NH<sub>3</sub> mediante la adición de álcali. El amoniaco se desprende de la muestra hacia la atmósfera de una cámara cerrada y es capturado por una solución ácida. El NH<sub>3</sub> liberado puede cuantificarse por titulación con ácido, con el reactivo de Nessler, por determinación fotométrica de color producido con ninhidrina o mediante la reacción del indofenol, por valoración culombimétrica con hidrobromuro producido electrónicamente u otros métodos. Actualmente estos métodos casi no se utilizan porque son poco exactos, poco precisos y tienen baja sensibilidad.

- Métodos de intercambio iónico

El NH<sub>3</sub> se separa del plasma por adsorción en una resina de intercambio catiónico. Se cuantifica después con el reactivo de Nessler o la reacción del indofenol en la que el NH<sub>4</sub> reacciona con el fenóxido sódico en presencia de hipoclorito y nitroprusiato, dando un color azul estable que se mide espectrofotométricamente. Estos métodos son generalmente más exactos y tienen buena sensibilidad, pero requieren un tratamiento prolongado, lo que afecta de manera importante a su reproducibilidad y a la rapidez de resultados.

- Métodos de electrodo selectivo

El amoniaco es liberado de la muestra por alcalinización. Se hace difundir a través de una membrana hidrófoba permeable al gas hacia una solución de cloruro de amonio acuoso, hasta que la presión parcial se iguala a ambos lados de la membrana. La hidrólisis de una pequeña porción del amonio disuelto con un electrodo de vidrio, utilizando un electrodo de referencia de plata-cloruro de plata, produce un aumento del pH que se mide. Este método presenta buena precisión y exactitud, pero la falta de estabilidad de los electrodos y las membranas han limitado su uso.

- Método de química seca

Tiene como base la tecnología de la química seca, que emplea reactivos multicapa incorporados en un soporte de poliéster. El método utilizado es una técnica colorimétrica a punto final. Usando tampones de pH alcalino el ión amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) se convierte en amoniaco gas ( $\text{NH}_3$ ), que reacciona con el indicador azul de bromofenol. Se obtiene un compuesto coloreado que se mide a 600 nm.

- Métodos enzimáticos

Son los más empleados. Se basan en la determinación de amonio plasmático utilizando la enzima glutamato deshidrogenasa (GLDH) que cataliza la conversión de amonio más  $\alpha$ -cetoglutarato a glutamato con la oxidación de NADPH a NADP+. La medida de la disminución de absorbancia a 340 nm es proporcional a la concentración de amoniaco. Este método fue introducido por Mondzac et al en 1965. Son métodos precisos, exactos, rápidos y requieren pequeños volúmenes de muestra.

- Métodos de medida de la presión parcial de amoniaco

La presión parcial de amoniaco ( $\text{pNH}_3$ ) se calcula en base a las concentraciones de amoniaco y pH en sangre usando la fórmula descrita por Manning. Como parámetro podría reflejar mejor la exposición cerebral al amoniaco, ya que representa la fracción no ionizada del mismo ( $\text{NH}_3$ ) que difunde libremente a través de la barrera hematoencefálica. Sin embargo, hay datos contradictorios al respecto, mientras algunos estudios demuestran que este parámetro no se correlaciona con el grado o gravedad de la EH mejor que la medida de amonio en muestra arterial o venosa (38, 45), otros señalan que la presión parcial de amonio es mejor parámetro para la evaluación fisiopatológica de la EH (46).

### Para tener en cuenta:

Las condiciones de recogida, transporte y procesamiento de la muestra, son fundamentales para garantizar la exactitud de los resultados.

Los métodos enzimáticos son los más empleados para el estudio del amonio por su precisión, exactitud y rapidez. Además, al estar automatizados permiten una disponibilidad y tiempo de respuesta muy adecuados con la urgencia médica.

### BIBLIOGRAFÍA:

1. **Recomendaciones para la utilización de la determinación de amonio en plasma en el Laboratorio Clínico.** Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Química Clínica 2007; 26 (5) 256-264.
2. Maranda Bruno, et. al. **False positives in plasma ammonia measurement and their clinical impact in a pediatric population.** Clinical Biochemistry 40 (2007) 531–535