

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
CARRERA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
BIOQUÍMICO CLÍNICO

“VALORACIÓN DEL SISTEMA INMUNE Y HEMATOLÓGICO EN TRABAJADORES
EXPUESTOS A COMPONENTES DE LA GASOLINA EN ESTACIONES DE SERVICIO
DE COMBUSTIBLE DE LA CIUDAD DE QUITO, 2016”

DIEGO PATRICIO CHÁVEZ DÍAZ

ADRIAN ISRAEL POVEDA PAREDES

DIRECTOR: Máster Oscar Puente Valdivia

QUITO, 2016

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, DIEGO PATRICIO CHÁVEZ DÍAZ, C.I. 171951250-9; autor del trabajo de graduación intitulado: “VALORACIÓN DEL SISTEMA INMUNE Y HEMATOLÓGICO EN TRABAJADORES EXPUESTOS A COMPONENTES DE LA GASOLINA EN ESTACIONES DE SERVICIO DE COMBUSTIBLE DE LA CIUDAD DE QUITO, 2016”, previa a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICO CLÍNICO en la Escuela de Bioanálisis:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.




DIEGO PATRICIO CHÁVEZ DÍAZ, C.I. 171951250-9

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, ADRIÁN ISRAEL POVEDA PAREDES, C.I. 171760589-1; autor del trabajo de graduación intitulado: “VALORACIÓN DEL SISTEMA INMUNE Y HEMATOLÓGICO EN TRABAJADORES EXPUESTOS A COMPONENTES DE LA GASOLINA EN ESTACIONES DE SERVICIO DE COMBUSTIBLE DE LA CIUDAD DE QUITO, 2016”, previa a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICO CLÍNICO en la Escuela de Bioanálisis:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.



ADRIÁN ISRAEL POVEDA PAREDES

ADRIÁN ISRAEL POVEDA PAREDES, C.I. 171760589-1

DEDICATORIA

A mi Dios y Creador porque en todo momento de mi vida ha demostrado estar presente apoyándome y guiándome; A mi madre Margarita con todo mi amor y Marco, y a mi abuelito Humberto porque siempre me escucharon, aconsejaron y dieron todo su apoyo durante mi vida, por eso compartimos ahora juntos la alegría de este triunfo.

Con cariño,
Diego Chávez Díaz

A Dios que me dio la vida, ya que gracias a su voluntad he llegado hasta este momento de alegría para mí y mi familia, a mis padres por su apoyo, sacrificio y comprensión durante todos estos años, gracias a ellos ahora puedo volar por mi cuenta. A todos a quienes de una u otra manera han contribuido en la elaboración de este trabajo.

Con cariño,
Adrián Poveda

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por habernos guiado en nuestras vidas y en este camino que emprendimos hasta este día de gran felicidad.

A nuestros queridos padres, quienes nos han impartido sus consejos y dado su apoyo incondicional, haciendo así posible este nuevo logro.

A Oscar Puente nuestro director, quien nos ha guiado durante la realización de esta investigación junto a su equipo de trabajo del laboratorio DISerLAB de la PUCE, quienes siempre nos recibieron y ayudaron con cariño.

A nuestra profesora Sandra Andrade, quien confió en nosotros desde el principio para la elaboración de este trabajo, por contribuirnos con su tiempo, conocimiento y consejos.

A los trabajadores y empleadores de las gasolineras del Distrito Metropolitano de Quito, que abrieron las puertas de sus establecimientos para permitirnos realizar la presente investigación.

A la Escuela de Bioanálisis de la PUCE, sus profesores y sus trabajadores quienes inculcaron en nosotros no solo conocimientos teóricos y prácticos, sino también un ideal de superación continua y de servicio a la comunidad.

RESUMEN

Valoración del sistema inmune y hematológico en trabajadores expuestos a componentes de la gasolina en estaciones de servicio de combustible de la ciudad de Quito, 2016

Introducción: La gasolina contiene cientos de componentes tóxicos como hidrocarburos alifáticos, benceno y plomo; estos pueden provocar consecuencias en la salud de los trabajadores, sobre todo cuando han estado expuestos de forma prolongada y sin protección al combustible, incluso si la cantidad en que los componentes tóxicos se presentan son mínimas. Las posibles consecuencias que podrían originar son: asma, defectos en la síntesis de hemoglobina, anemia, nefropatías, abortos, daño cerebral, formación de tumores cancerígenos, leucemia, modulación anormal del sistema inmune y hematopoyético. Por este motivo, la presente investigación pretende revelar las posibles secuelas que hasta el momento se han producido en la salud de los despachadores de gasolina, iniciando por la valoración del sistema inmune y las posibles alteraciones hematológicas. **Materiales y métodos:** Este es un estudio observacional de tipo transversal que se enfoca en la descripción y reporte de frecuencias de las posibles alteraciones en el sistema inmune y hematológico de los despachadores de combustible, debido a la exposición constante con los componentes químicos de la gasolina. Se tomaron gasolineras de la ciudad de Quito de forma aleatoria, y de estas, se analizaron un total de 61 muestras sanguíneas de los despachadores que cumplieron los criterios de inclusión y firmaron un consentimiento informado. Dentro del análisis se les realizó: una Biometría hemática automatizada y estudio de placa de sangre periférica, una cuantificación sérica de inmunoglobulinas IgG e IgA por nefelometría cinética y un ensayo para evaluar la capacidad fagocítica de sus células PMN aisladas. **Resultados:** Con respecto a los contajes celulares de los despachadores estudiados se encontró que: el 32,8% presentó neutropenia; el 19,7% linfocitosis, el 14,8% basofilia, el 23% hematocrito alto y el 32,8% altas concentraciones de hemoglobina. En el estudio de placa se halló que: el 39,3% de los pacientes tenía un promedio de 7 ± 2 (%) hipersegmentados sobre 100 neutrófilos contabilizados y en el 47,5% se encontró una cantidad considerable de linfocitos con granulación citoplasmática; Con relación a la serie roja se notó que el 67,2% de los trabajadores presentaba algún tipo de poiquilocitosis. En la cuantificación de las inmunoglobulinas IgG e IgA se encontró que el 23% y 29,5% respectivamente, tenía valores elevados o muy cercanos al límite del valor de referencia. También se observó que en más de la mitad de los trabajadores estudiados (59%), la función fagocítica de los neutrófilos frente a la cepa ATCC 25923 de *S. aureus* estaba disminuida. **Conclusiones y Recomendaciones:** En este estudio se ha evidenciado que si existe modulación en el sistema inmune y hematológico de los despachadores de gasolina y que además su organismo se encuentra frente a un estado de inflamación crónica. Por esta razón recomendamos el uso de equipos de protección como mascarillas y otros que impidan la inhalación y el contacto directo con los vapores tóxicos de la gasolina, tanto para los trabajadores antiguos como nuevos. Además, recomendamos realizar un estudio de tipo caso-control que permita establecer grados de significancia respecto al tiempo de exposición y los resultados encontrados en este estudio; Así mismo, considerar una interconsulta con un médico hematólogo para llegar a un diagnóstico clínico conciso de los pacientes que presentaron afecciones y así evitar mayores repercusiones en su salud.

PALABRAS CLAVE: Sistema inmune, sistema hematológico, gasolina, benceno, plomo, despachador de combustible, exposición ocupacional.

ABSTRACT

Immunological and hematological systems assessment in workers exposed to gasoline components in gas stations in Quito, 2016

Introduction: The fuel is indeed known for having hundreds of toxic components like aliphatic hydrocarbons, benzene and lead that the minimal but long exposure without protection equipment could cause health consequences in the gas station's workers. These health problems could be asthma, hemoglobin synthesis defects, anemia, nephropathies, abortion, brain damage, carcinogenic tumors, leukemia, abnormal immunological and hematological modulation, etc. For these reasons, this project tries to reveal possible aftermaths in gas station worker's health, given to their strong exposure to the present day. The immunological and hematological alterations assessments were carried out as well as security and occupational health measures were suggested in this research. **Materials and methods:** This is an observational and transverse study, which focuses in describing and reporting frequencies of possible alterations in immunological and hematological systems of workers at gas stations. Some gas stations in Quito were randomly chosen and Sixty-one workers' blood samples were analyzed. They had to fulfill inclusion criteria, go over the exclusion criteria and sign an informed consent. The analysis performed included: An automated complete blood count and study of peripheral blood smear, a serum quantification of IgG and IgA by kinetic nephelometry and an assay to evaluate the PMN's phagocytic activity. **Results:** Regarding the blood cells count: 32.8% of workers had neutropenia, 19.7% had lymphocytosis, 14.8% basophilia, 23% had high hematocrit levels and the 32.8% had high hemoglobin concentrations. The blood smear study revealed 7 ± 2 (%) hypersegmented neutrophils on average in 39.9% of the workers; it was also found considerable numbers of lymphocytes with cytoplasmic thick granules in 47.5% of the patients. In relation to the red blood cells, poikilocytosis of different sorts were observed in 67.2% of the workers. An increase in the quantity of IgG and IgA antibodies were found in 23% and 29.5% respectively, compared to the reference values. Besides, more than a half of workers (59%) showed a decreased phagocytic activity against *S. aureus* ATCC 25923. **Conclusions and Recommendations:** These results indicate that there is modulation in the immunological and hematological systems of workers at fuel dispenser in gas stations and their organisms are in a chronic inflammatory condition. For this reason, we recommend the whole work team at the fuel dispensers -old and new workers- to wear masks and else personal protection equipment in order to stop breathing directly the toxic gasoline vapor compounds. In the same way, we suggest making a case-control study to establish significance degrees in relation to the exposure time and the results found during this study. Finally, a medical consultation with a hematologist is essential for those with altered results in order to get a clinical diagnostic as these patients could have major issues in their health.

KEY WORDS: Immune system, hematological system, gasoline, benzene, lead, gas station worker, occupational exposure.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN

1.1	JUSTIFICACIÓN	15
1.2	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
1.3	OBJETIVOS	17
1.3.1	OBJETIVO GENERAL	17
1.3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
1.4	LIMITACIONES DEL ESTUDIO	18
	CAPÍTULO II	19
	MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL	19
2.1	ANTECEDENTES	19
2.2	MARCO TEÓRICO	21
2.2.1	GASOLINA Y SUS COMPONENTES	21
2.2.2	ALTERACIONES HEMATOLÓGICAS POR TOXICIDAD	24
2.2.3	ALTERACIONES INMUNOLÓGICAS POR TOXICIDAD	27
2.2.4	MÉTODOS DE ANÁLISIS	31
2.3	MARCO CONCEPTUAL	35
	CAPITULO III	37
	MARCO METODOLÓGICO	37
3.1	TIPO DE ESTUDIO	37
3.2	TIPO DE MUESTREO	37
3.3	TAMAÑO DE MUESTRAL	37
3.4	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	40
3.5	MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.5.1	MATERIALES	41
3.6	PROCEDIMIENTO	43
3.6.1	FASE UNO: CRIBAJE DE LA POBLACIÓN	43
3.6.2	FASE DOS: EXTRACCIÓN DE MUESTRAS	43
3.6.3	FASE TRES: ANALISIS DE MUESTRAS	43
3.7	CONTROL DE CALIDAD	47
3.7.1	Control de calidad de la biometría hemática automatizada	47
3.7.2	Control de calidad del frotis sanguíneo	47
3.7.3	Control de calidad de la cuantificación de las inmunoglobulinas	48

3.7.4 Control de calidad del ensayo fagocítico	48
CAPÍTULO IV	49
RESULTADOS	49
4.1 DATOS SOCIO-LABORALES	49
4.1.1 ALTERACIONES HEMATOLÓGICAS	50
4.1.2 ALTERACIONES INMUNOLÓGICAS.....	61
DISCUSIÓN.....	67
CONCLUSIONES.....	71
RECOMENDACIONES	72
BIBLIOGRAFÍA	73
ANEXOS.....	76

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Datos socio-laborales de los trabajadores participantes

Tabla 2 Ambiente laboral de los despachadores de las estaciones de servicio encuestadas

Tabla 3 Frecuencias de contajes normales y alterados de glóbulos rojos y blancos en despachadores

Tabla 4 Frecuencias de los contajes normales y alterados de neutrófilos en despachadores

Tabla 5 Frecuencias de despachadores con neutropenia por tiempo de exposición

Tabla 6 Frecuencias de despachadores con linfocitosis por tiempo de exposición

Tabla 7 Frecuencias de despachadores con basofilia por tiempo de exposición

Tabla 8 Frecuencias de los hematocritos normales y alterados en despachadores

Tabla 9 Frecuencias de despachadores con hematocrito elevado por tiempo de exposición

Tabla 10 Frecuencias de despachadores con hemoglobina elevada por tiempo de exposición

Tabla 11 Frecuencias de hipersegmentación y bilobulación en neutrófilos de despachadores

Tabla 12 Casos y tipos de células inmaduras encontradas en despachadores

Tabla 13 Casos y tipos de anomalías encontradas en los eritrocitos en el estudio de placa

Tabla 14 Frecuencias de alteraciones encontradas en la cuantificación de IgG

Tabla 15 Frecuencias de despachadores con valores alterados de IgG por tiempo de exposición

Tabla 16 Frecuencias de alteraciones encontradas en la cuantificación de IgA

Tabla 17 Frecuencias de despachadores con valores alterados de IgA por tiempo de exposición

Tabla 18 Frecuencias de anomalías hematológicas e inmunológicas agrupadas según el tiempo de exposición de los trabajadores

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Despachadores de gasolina participantes por género

Gráfico 2 Frecuencias de los contajes normales y alterados de linfocitos en despachadores

Gráfico 3 Frecuencias de los contajes normales y alterados de monocitos en despachadores

Gráfico 4 Frecuencias de los contajes normales y alterados de basófilos en despachadores

Gráfico 5 Frecuencias de concentraciones normales y alteradas de hemoglobina en despachadores

Gráfico 6 Frecuencias de alteraciones encontradas en el estudio de la función fagocítica

Gráfico 7 Agrupación de las frecuencias de anomalías hematológicas e inmunológicas en los trabajadores, según el tiempo de exposición

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Hematopoyesis y linfopoyesis.

Figura 2 Anormalidades en células sanguíneas vistas en estudio de placa con tinción Wright.

Figura 3 Enzimas inhibidas por el plomo en la síntesis del hemo.

Figura 4 Proceso de la fagocitosis.

Figura 5 Anormalidades en leucocito neutrófilo.

Figura 6 Selección de gasolineras al azar.

Figura 7 Granulación citoplasmática linfocitaria.

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Gasolineras de quito seleccionadas al azar.

Anexo 2: Carta de presentación

Anexo 3: Encuesta al empleador

Anexo 4: Encuesta al trabajador

Anexo 5: Consentimiento informado

Anexo 6: Insertos para determinación de IgA e IgG.

Anexo 7: Inserto para el aislamiento de PMN.

Anexo 8: Control de calidad de BH en el equipo ABX PENTRA 60

Anexo 9: Control de calidad para la determinación de inmunoglobulinas por nefelometría.

Anexo 10: Control calidad del ensayo fagocítico.

Anexo 11: Acta de recepción de resultados y recomendaciones

Anexo 12: Galería de fotos de los autores.

LISTA DE SIGLAS

ARCH: Agencia de Regulación y Control Hidrocarburífero

PMN: Leucocito Polimorfonuclear

NK: Linfocito Natural Killer

HS: Hipersegmentado

VCM: Volumen Corpuscular Medio

MCH: Hemoglobina Corpuscular Media

MCHC: Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media

BH: Biometría Hemática

VR: Valor de Referencia

INTRODUCCIÓN

La gasolina es una solución que contiene cientos de compuestos químicos conocidos como hidrocarburos derivados del petróleo y entre sus componentes se encuentran principalmente los alifáticos, luego en menor proporción los aromáticos, de los que se destacan el benceno y todos sus derivados por su alta toxicidad. El plomo es igualmente un compuesto tóxico que actualmente no se conoce si está presente o no en la gasolina, pero sí que se utilizó como aditivo y antidetonante (tetraetilo de plomo) en el combustible hasta el 2011 según la Agencia de Regulación y Control Hidrocarbúrico (ARCH). Sin embargo, aunque se ha dejado de añadir intencionalmente este compuesto organometálico, esta entidad no asegura haber realizado un análisis de plomo en la gasolina que se expende actualmente en el país que asegure que tiene 0% de plomo. (ARCH, 2014); (Math & Jelovcan, 2010)

En conjunto, los componentes de la gasolina representan un peligro para la salud de los trabajadores. Los hidrocarburos alifáticos, el plomo, el benceno y sus derivados son compuestos tóxicos que pueden ocasionar graves secuelas en la salud de los trabajadores, sobre todo cuando ellos han estado expuestos durante años sin usar equipos de protección personal y cumpliendo con largas jornadas de trabajo de 12 e incluso 24 horas. Debido a esta fuerte exposición, mínimas cantidades -incluso a nivel de trazas- de dichos compuestos tóxicos ingresando al organismo constantemente pueden causar daños en varios tejidos y órganos de los trabajadores tales como: hipoxia, asma, lesiones pulmonares, defectos en la síntesis de hemoglobina, anemia, nefropatías, abortos, daño cerebral, formación de tumores cancerígenos, leucemia, modulación anormal del sistema inmunológico y hematológico. (Ordoñez, 2013); (Peña, 2010)

Estos signos y síntomas pueden desarrollarse silenciosamente sin que haya evidencia de intoxicación, por este motivo la presente investigación pretende revelar las secuelas que hasta el momento se han producido en los sistemas inmune y hematológico de los trabajadores despachadores de combustible y así contribuir a establecer medidas de seguridad y pautas de salud ocupacional que hasta el momento no han sido estandarizadas por parte de las autoridades para este grupo poblacional, las mismas que permitan disminuir posibles efectos dañinos en los trabajadores y mejorar su calidad de vida.

1.1 JUSTIFICACIÓN

Según la Agencia de Regulación y Control Hidrocarburífero (ARCH), en la ciudad de Quito existen un total de 95 gasolineras en funcionamiento, hasta el 2015. La misma entidad afirma que la gasolina que se expende en el país contiene cero por ciento de plomo. El Ministerio del Ambiente del Ecuador ratifica lo aseverado por el ARCH y menciona que en el ambiente no existe contaminación por plomo debido al combustible. Sin embargo, ambas instituciones comentan que no han analizado plomo en la gasolina que se expende en las gasolineras ni en el aire de la ciudad de Quito respectivamente; y según EP PETROECUADOR no hay estadísticas o casos reportados de intoxicación con plomo u otros componentes del combustible en los trabajadores despachadores de las gasolineras de la ciudad. Por lo tanto, no hay evidencia física de las afirmaciones hechas por las instituciones antes mencionadas. (EP PRETROECUADOR, 2014); (ARCH, 2014)

Adicionalmente, se conoce que la gasolina es una mezcla de una gran cantidad de compuestos químicos denominados hidrocarburos y que son potencialmente tóxicos para la salud debido a su volatilidad y por ende su fácil inhalación y absorción; los hidrocarburos de mayor presencia en la gasolina son los alifáticos seguidos por los hidrocarburos aromáticos de los cuales el benceno es el más significativo para el presente estudio, todos estos hidrocarburos tienen un efecto tóxico sobre la salud de los trabajadores que laboran en las estaciones de servicio. (Peña, 2010)

Las consecuencias que desencadena la exposición mínima pero prolongada a los gases de la gasolina y concentraciones de plomo incluso en trazas son: asma, defectos en la síntesis de hemoglobina, anemia, nefropatías, abortos, daño cerebral, modulación anormal del sistema inmune y hematopoyético. Los signos y síntomas pueden desarrollarse silenciosamente sin tener evidencia de intoxicación. (Lan & Zhang, 2006). También puede existir la formación de tumores cancerígenos o leucemias que provoquen daños irreversibles, o incluso la muerte del trabajador si la exposición continúa sin ningún equipo de protección personal durante sus labores. (Math & Jelovcan, 2010)

Por este motivo, es imprescindible y de suma importancia investigar las posibles secuelas que hasta el momento se han producido de manera silenciosa en la salud de estos

trabajadores ya que los mismos han estado expuestos durante años sin ningún tipo de protección a los componentes tóxicos de la gasolina.

El objetivo de este proyecto es valorar el sistema inmune -la defensa del cuerpo humano contra varias enfermedades- y revelar las posibles alteraciones hematológicas de los despachadores de combustible. También contribuir a establecer pautas de seguridad en salud ocupacional por parte de las autoridades para prevenir los efectos dañinos que produce la exposición a estos compuestos en nuevos empleados y evitando el deterioro de la salud del personal más antiguo; estas medidas podrán mejorar la calidad de vida y el estado de salud en este grupo poblacional.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El tipo de gas combustible para automóviles que se utiliza en Ecuador si bien ha sido modificado para aumentar su octanaje y bajar los niveles de emisión de gases, aún sigue siendo un contaminante tóxico para el ser humano, ya que entre los componentes de este se encuentran plomo, azufre, gran cantidad de hidrocarburos alifáticos, benceno y sus derivados, los cuales son conocidos por causar severos problemas respiratorios, renales, hematológicos, deficiencias en el sistema inmune, alteraciones hormonales y del metabolismo, así como defectos neurológicos y cambios comportamentales. (Repetto, 2009)

En este contexto, los trabajadores que tienen la labor de despachadores de gasolina en las diferentes estaciones de servicio de combustible, constituyen un grupo de personas expuestas directamente a los componentes de la gasolina en forma aérea y cutánea. El tema se vuelve crítico si se resalta el hecho de que ninguna de estas personas tiene algún tipo de protección personal durante su jornada de trabajo. Además, su exposición es prolongada y frecuente, ya que la mayoría de ellos tienen jornadas de trabajo de hasta 24 horas.

Un problema más evidente se da una vez que estos componentes ingresan al cuerpo y no pueden ser catabolizados. En el caso del plomo, se acumula en: eritrocitos, cabello, dientes, huesos y ciertos tejidos, dañándolos con el pasar del tiempo, aun cuando la exposición sea

mínima pero constante. En el caso de los vapores del benceno, provoca problemas como: hematopoyesis ineficiente o desarrollo de leucemias. Bajo estas circunstancias no evidencian sintomatología, por el contrario se da un deterioro lento en los sistemas del cuerpo, afectando su estado inmunológico y hematológico (Math & Jelovcan, 2010)

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, y a pesar de las reformas realizadas por el gobierno ecuatoriano para precautelar la salud de los empleados vigilando el cumplimiento de las leyes en el campo de salud ocupacional, no se puede asegurar una condición de salud adecuada para este grupo poblacional, posiblemente porque los chequeos médicos no están orientados a detectar problemas relacionados a la exposición constante con los componentes del combustible de uso común en nuestro país. (Rodríguez & Borrego, 2002)

Frente a esta problemática el presente estudio intenta responder la siguiente interrogante: ¿Qué secuelas se han producido en el sistema inmune y hematopoyético de los despachadores de gasolina como consecuencia de la exposición a los componentes del combustible que se expende en la ciudad de Quito?

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la modulación del sistema inmune y hematopoyético como consecuencia de la exposición continua a los componentes de la gasolina en trabajadores despachadores de algunas estaciones de servicio de combustible de la ciudad de Quito.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer las condiciones socio-demográficas y laborales en las que se desenvuelven los despachadores de gasolina de la ciudad de Quito, mediante una encuesta estructurada aplicada a ellos y sus empleadores.

- Determinar las alteraciones hematológicas presentes en los despachadores de gasolina de la ciudad de Quito, mediante el estudio de placa de sangre periférica y los parámetros de análisis de la biometría hemática.
- Estimar las alteraciones en el sistema inmune de los despachadores de gasolina de la ciudad de Quito, mediante la evaluación cualitativa de la función fagocítica de los neutrófilos por medio del ensayo fagocítico y la cuantificación de las concentraciones séricas de IgA e IgG por nefelometría.
- Correlacionar las alteraciones halladas en el sistema inmune y hematológico, con los valores de referencia para cada examen realizado y las condiciones socio-demográficas y laborales de los despachadores de gasolina de la ciudad de Quito.
- Establecer medidas de protección para disminuir el riesgo a la exposición de los componentes de gasolina en los despachadores de gasolina actuales y nuevos.

1.4 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Una limitación del estudio es que solo se determinará en estos trabajadores el estado inmune y las alteraciones hematológicas debidas a la exposición de los componentes del combustible que se expende en la ciudad, y puesto que la gasolina contiene una gran cantidad de elementos considerados tóxicos (plomo, azufre, benceno y sus derivados, olefinas, etc.) no se puede saber cuál o cuáles son los que están causando un daño mayor.

Otra limitante del estudio es el hecho de que pueden existir afecciones en otros órganos y sistemas de estos trabajadores, tales como: pulmón, riñón, sistema circulatorio o nervioso central, pero que no se evaluarán en este estudio.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

2.1 ANTECEDENTES

La comercialización de la gasolina en Ecuador está liderada por la empresa EP PETROECUADOR con 262 estaciones de servicio con cobertura a nivel nacional; dicha empresa registra más de 2.500 trabajadores que poseen poca o ninguna protección y que están en contacto directo con los surtideros de gasolina. (EP PRETROECUADOR, 2014).

En 1999, la gasolina en el país tenía plomo como antidetonante, provocando contaminación indirecta a los individuos y el medio ambiente. Mediante Acuerdo Ministerial No 112 publicado en el Registro Oficial 308 del 30 de abril de 1998, se autorizó la producción y comercialización a nivel nacional de dos tipos de gasolina: la una denominada EXTRA de 80 octanos y la otra SUPER de 89 octanos. Estos productos se comenzaron a elaborar en las refinerías de Esmeraldas, La Libertad, terminales Beaterio y Pascuales, bajando los niveles del aditivo tetraetileno de plomo. (Mejía, 2010).

El gobierno nacional a partir del 2011, asumió el compromiso de mejorar el octanaje de la gasolina que distribuye a través de PETROECUADOR, por lo cual, en búsqueda de cumplir la norma de calidad EURO 5, aumentó el octanaje de 87 a 92 octanos para la gasolina SUPER. Se asegura que esta gasolina ya no contiene plomo, sin embargo, no hay registros de análisis que lo aseveren y los gases propios del combustible siguen haciendo su efecto en los despachadores. (EL COMERCIO, 2012).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha incluido el plomo dentro de una lista de diez productos químicos causantes de graves problemas de salud pública que exigen la intervención de los estados miembros para proteger la salud de los trabajadores, los niños y las mujeres en edad fértil (OMS, 2014).

Las consecuencias que desencadena la exposición prolongada a los gases de combustible se evidencia con la manifestación de enfermedades graves tales como asfixia, embolia pulmonar, asma, daño cerebral, perturbación de la síntesis de la hemoglobina y modulación

anormal del sistema inmune, las mismas que se pueden desarrollarse de forma silenciosa o abrupta, incluso puede presentarse formación de tumores cancerígenos si la exposición continúa por largo tiempo (Sansar, 2012). En cuanto al plomo, tiene un complejo mecanismo tóxico de distribución que incluye la ubicación en compartimentos, en tejidos blandos (riñón, hígado, cerebro) y en tejidos compactos (huesos y dientes); el benceno con sus derivados contribuye al deterioro del sistema hematológico ya que por ser un compuesto lipofílico tiende a depositarse en tejidos ricos en estos compuestos, como sucede en la médula ósea. (Mejía, 2010); (Peña, 2010).

Con este antecedente, y a pesar de los esfuerzos gubernamentales que se enfocan mayormente en evitar la contaminación ambiental, existe un riesgo latente de salud ocupacional en los despachadores de gasolina en las estaciones de servicio de venta de combustibles, debido a su constante exposición de los gases de la gasolina, y quizá con trazas de plomo todavía.

En China, al 2006, en una investigación realizada por Lan & Zhang, en la que se estudiaron 250 obreros de talleres de zapatos expuestos de forma aérea al benceno en concentraciones menores a 1ppm comparándolos con un grupo control formado por 140 individuos. El estudio se basó en la medición de benceno, cantidad de colonias linfocitarias formadas a partir de células progenitoras, las variantes genéticas de Citocromo P4502E1 y el conteo diferencial de células blancas y plaquetas. Estos resultados fueron comparados con los del grupo control, encontrándose que las concentraciones de los parámetros medidos en los trabajadores expuestos a los vapores de benceno estuvieron significativamente disminuidas. Esto demuestra que las personas que inhalan benceno, incluso en cantidades mínimas y de manera constante, sufren problemas hematotóxicos. (Lan & Zhang, 2006)

Así mismo, en China, al 2015, en una investigación realizada por Ling-li & Guang-hui se estudiaron trabajadores expuestos a diferentes concentraciones de benceno comparándolos con un grupo control. Los resultados indicaron que los trabajadores expuestos a 1ppm de benceno tuvieron un conteo de leucocitos de 5.57 ± 1.79 (K/ μ L), los expuestos a 1.8ppm tuvieron un conteo de 5.27 ± 1.54 (K/ μ L), mientras que los no expuestos presentaron un conteo de 6.47 ± 1.40 (K/ μ L). Estos resultados una vez analizados fueron estadísticamente

significativos, lo que indica que la exposición al benceno incluso en bajas concentraciones pero contantemente, tiene efecto en el sistema hematopoyético provocando disminución del contaje leucocitario, aún sin demostrar leucopenia. (Ling-Li & Guang-hui, 2015).

En otro estudio realizado en Canadá, al 2015, por Carlsten & Blomberg, en el que se investigó a voluntarios que fueron expuestos a dos horas de inhalación de vapores diluidos de diesel con el objetivo de demostrar si la exposición provoca inflamación de la vía aérea inferior y la activación de las células inmunes. Los resultados señalaron que los vapores de diesel inclusive por un periodo corto de tiempo (2h) tienen un efecto en el aumento de productos de inflamación aguda. Además, induce a una activación de los linfocitos Th2, la producción de IL-5, responsable de estimular el crecimiento de linfocitos B, aumentar la secreción de anticuerpos y atraer a los eosinófilos. La proteína catiónica eosinofila (ECP) a su vez provoca un estado de inflamación en las vías aéreas, que pueden llevar a un estado de cronicidad. (Carlsten & Blomberg, 2015)

2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 GASOLINA Y SUS COMPONENTES

Las gasolinas son una mezcla compleja de hidrocarburos inflamables y volátiles con un rango de ebullición de 50°C a 200°C que se obtienen después de la destilación del crudo de petróleo. El número de octanos de una gasolina indican la temperatura y presión a la que puede ser sometido el combustible antes de detonarse, entre mayor es el octanaje de un combustible, mayor desempeño poseerá el vehículo que lo use. (Matos, 2011).

Un análisis proporcionado por la Agencia de Regulación y Control Hidrocarburiífero (ARCH) en el año 2015 muestra los hidrocarburos que componen la gasolina son los hidrocarburos alifáticos en un 51.15% e hidrocarburos aromáticos en un 19.35% (en los que se incluyen benceno, tolueno y sus derivados), además posee otros hidrocarburos como naftenos, olefinas e hidrocarburos de cadena larga. (ARCH, 2014).

En el Ecuador antes del 2011 la gasolina EXTRA y SUPER poseían 81 y 90 octanos respectivamente además contenían compuestos orgánicos de plomo que se usaban con el fin de mejorar el octanaje y servir como antidetonantes; debido a la contaminación que significan para el medio ambiente y las consecuencias tóxicas sobre la salud varios países desde la década de los setenta han ido prohibiendo el uso de plomo como aditivo para la gasolina, pero se calcula que 50 países todavía lo usan en la actualidad. (Peña, 2010). Desde 2011 el gobierno ecuatoriano decidió aumentar el octanaje de las gasolinas EXTRA y SUPER a 87 y 92 octanos mejorando así la calidad del combustible sin embargo como hemos mencionado anteriormente no se han testeado componentes de plomo ni de otros metales pesados en la gasolina que se expende actualmente en el país. (INEN, 2012)

2.2.1.1 HIDROCARBUROS

Los hidrocarburos son un amplio grupo de compuestos orgánicos que están formados por átomos de hidrogeno y carbono, pueden encontrarse aislados o mezclados con una variedad de productos de uso comercial o industrial como por ejemplo la gasolina, solventes, entre otros. Los hidrocarburos pueden tener varias longitudes lo que afecta su comportamiento y su estado a temperatura ambiente. A estos compuestos se los puede dividir en alifáticos (cadena lineal), halogenados (uno o más átomos de hidrógeno es sustituido por el de halógenos) y aromáticos (cíclicos, que contienen anillo de benceno).

Los hidrocarburos alifáticos pese a encontrarse en mayor cantidad en la gasolina tienen una toxicidad menor en relación al benceno y sus derivados puesto que su acción es indirecta sobre el sistema hematológico, pero también afectan a otros sistemas y tejidos. Cabe mencionar que los hidrocarburos presentes en la gasolina tienen acción tóxica sobre varios tejidos del cuerpo principalmente sobre el sistema nervioso central, sin embargo en la presente investigación solo se toma en cuenta a aquellos hidrocarburos que actúan sobre los sistemas hematológico e inmune, también hay que mencionar que los hidrocarburos halogenados y los aromáticos como el tolueno y xileno se encuentran muy escasamente presentes en la gasolina, por lo tanto solo se mencionará al benceno por parte de esta familia de hidrocarburos ya que tiene acción directa sobre el sistema hematológico e inmune. (Silos, 2008).

2.2.1.2 BENCENO

El benceno es un líquido claro ampliamente utilizado en la industria química, es muy volátil e inflamable y presenta un intenso olor dulce, muchos estudios epidemiológicos y ocupacionales lo ubican como un compuesto con capacidad carcinogénica, en la gasolina se encuentra tanto en su estado sin conjugarse como formando muchos derivados todos estos son productos de la destilación del crudo de petróleo.

Su absorción ocurre rápidamente por ingesta, inhalación y absorción dérmica, gracias a su capacidad lipofílica puede atravesar las membranas alveolares hacia la circulación sanguínea, esta etapa sanguínea es breve ya que rápidamente se acumula en tejidos ricos en lípidos como el cerebro, el hígado y la médula ósea. Después de su absorción una parte menor al 1% sin transformar es eliminado por la orina mientras que del 10 al 50% es eliminado por el aire espirado según la actividad metabólica y la cantidad del tejido adiposo, el resto es metabolizado fundamentalmente en el hígado. (Ordoñez, 2013)

2.2.1.3 PLOMO

El plomo es un metal gris azulado distribuido por toda la tierra en un gran número de minerales, se calcula que el contenido de plomo en la corteza terrestre es de 13 mg/Kg y se puede encontrar en estado elemental o en sus dos estados de oxidación Pb (II) y Pb (IV) y tiene amplio uso en varias industrias debido a su gran resistencia a la corrosión. El plomo es la primera causa de intoxicación ocupacional del mundo, los compuestos orgánicos de plomo han sido utilizados como aditivo para gasolina para incrementar el octanaje y como antidetonante. (Peña, 2010)

La absorción del plomo se da por vía intestinal, pulmonar o dérmica, sin embargo, la principal vía de absorción en los adultos con exposición ocupacional es la respiratoria ya que de un 30% a 40% del total del plomo inhalado alcanza la circulación sistémica. Una vez en el organismo el plomo se mueve por tres compartimentos: sangre, tejidos blandos y esqueleto. En la sangre 99% del plomo se encuentra en los eritrocitos mientras que 1% se encuentra en el plasma teniendo una vida media de 35 días y su difusión al resto del cuerpo es lenta y puede tardar de 4 a 6 semanas. En los tejidos blandos su vida media es de 40

días; el esqueleto puede almacenar alrededor del 90% del plomo acumulado en el organismo y allí su vida media es de 20 a 30 años. En general el metabolismo del plomo genera compuestos tóxicos y se elimina del cuerpo muy lentamente lo que facilita su acumulación. De esta manera el plomo puede afectar a varios sistemas del cuerpo como el sistema nervioso, el sistema cardiovascular y tejidos blandos como el riñón sin embargo debido al objetivo de la presente investigación se mencionará solo aquellas secuelas que tengan que ver con el sistema hematológico e inmune. (Peña, 2010).

2.2.2 ALTERACIONES HEMATOLÓGICAS POR TOXICIDAD

Durante la vida posnatal en el hombre, los eritrocitos, los polimorfonucleares (PMN), monocitos y las plaquetas normalmente se producen y maduran en la médula ósea, mientras que los linfocitos se producen en la médula ósea y maduran en el timo. En la médula ósea existe una célula madre pluripotencial que da lugar a dos progenitores mayores: la célula madre linfoide y la célula madre mieloide o hematopoyética. Cada una de estas células progenitoras madura en diferentes tipos celulares gracias a la ayuda de diferentes estímulos de moléculas especializadas denominadas citocinas hasta convertirse en una célula madura final que circula por sangre periférica o se localiza en diferentes tejidos del cuerpo humano. La célula progenitora linfocítica origina linfocitos B y T, mientras que la célula progenitora mielocítica es una precursora común para PMN, monocitos, eritrocitos y plaquetas, todo este proceso se denomina hematopoyesis. Ver **Figura 1.** (Henry, 2012)

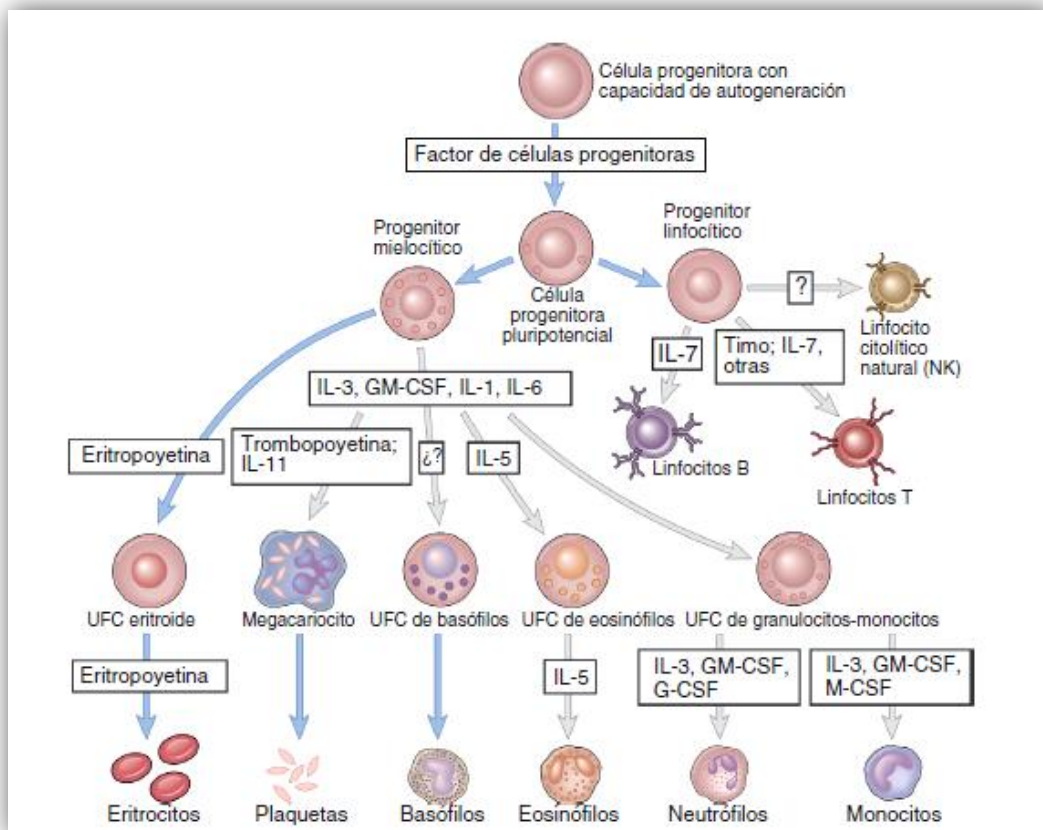


FIGURA 1 Hematopoyesis y linfopoyesis
Fuente: (Abbas, 2012)

En el cuerpo humano es indispensable que todas estas células se mantengan íntegras y en concentraciones determinadas como normales, ya que cada una cumple con funciones específicas. Por ejemplo, un número adecuado de hematíes y una concentración de hemoglobina dentro del rango establecido para cada edad y sexo, promueven el correcto intercambio de gases y nutrientes en el organismo, ayudando a la oxigenación del cuerpo, eliminación de dióxido de carbono y toxinas, contribuyendo así al bienestar de la persona.

Los hidrocarburos en su mayoría afectan al pulmón causando lesiones que reducen la función de ventilación y perfusión pulmonar debido a su alta volatilidad y viscosidad que destruyen el factor surfactante alveolar, además varios de estos compuestos pueden atravesar fácilmente la membrana alveolar llegando a la circulación sanguínea y causando daños en el sistema nervioso central, otros de estos compuestos son hepatotóxicos; no se han descrito mayores afectaciones por parte de estos compuestos sobre el sistema inmune o hematológico, salvo que estos compuestos al ser gaseosos actúan como asfixiantes cuando

se inhalan y su presencia desplaza al oxígeno causando baja presión parcial arterial de oxígeno e hipoxia; por esta razón ante una exposición crónica los eritrocitos se ven mermados en su capacidad de oxigenar las células del cuerpo y están obligados a aumentar en tamaño y número causando poliglobulia, anemia macrocítica y aumento en la concentración de hemoglobina en compensación a dicha disfunción. (Peña, 2010)

La exposición a benceno estimula la enzima CYP 450 generando radicales libres de oxígeno que son los causantes de la mayor toxicidad, como la médula ósea es un depósito donde se acumula este hidrocarburo los radicales libres son los responsables de los efectos tóxicos sobre las células progenitoras sanguíneas, provocando una disminución de las concentraciones de los componentes figurados maduros en sangre periférica y a la vez, la aparición de células inmaduras (ver **Figura 2**) causando anemia aplásica, leucemia mieloide aguda, trastornos linfoproliferativos; el mecanismo preciso del potencial leucémico del benceno aún no es del todo conocido aunque se han encontrado alteraciones cromosómicas como translocaciones y deleciones principalmente en los cromosomas cinco y siete en el 90% de los pacientes afectados. (Peña, 2010)

El plomo inhibe la enzima pirimidin-5'-nucleotidasa, por lo que se acumulan fragmentos de RNA en el eritrocito (punteado basófilo; ver **Figura 2**) y afecta a su maduración volviéndolo susceptible a hemólisis en la circulación periférica, adicionalmente está disminuida la síntesis de la globina, el recuento de unidades formadoras de colonias eritroides y la producción de eritropoyetina.

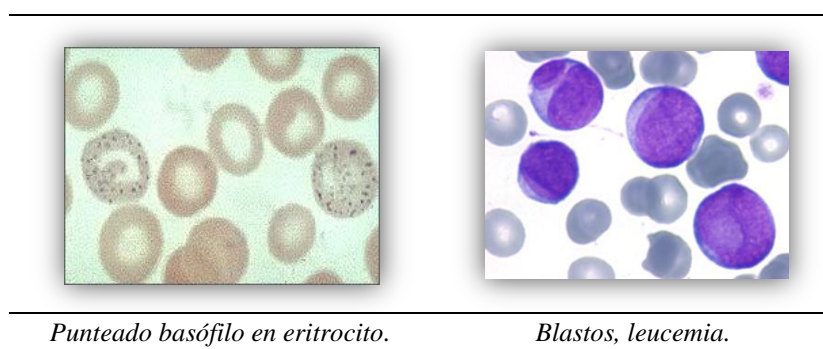


FIGURA 2 Anormalidades en células sanguíneas vistas en estudio de placa con tinción Wright
Fuente: (Centro de Formación San José de Calasanz, 2010)

Además, el plomo es un catión divalente que no tiene funciones fisiológicas en el organismo, sin embargo, tiene la capacidad de unirse a los grupos sulfhidrilos de las proteínas reemplazando a otros cationes divalentes, siendo esta la principal causa de toxicidad ya que este mecanismo de reemplazo causa daño en proteínas estructurales y enzimas; de esta manera puede unirse a varias proteínas que cumplen un papel clave en la captación, transporte y utilización del hierro como la transferrina, mucina, mobilferrina, hemoglobina y 4 enzimas para síntesis del grupo hemo. Ver **Figura 3**.

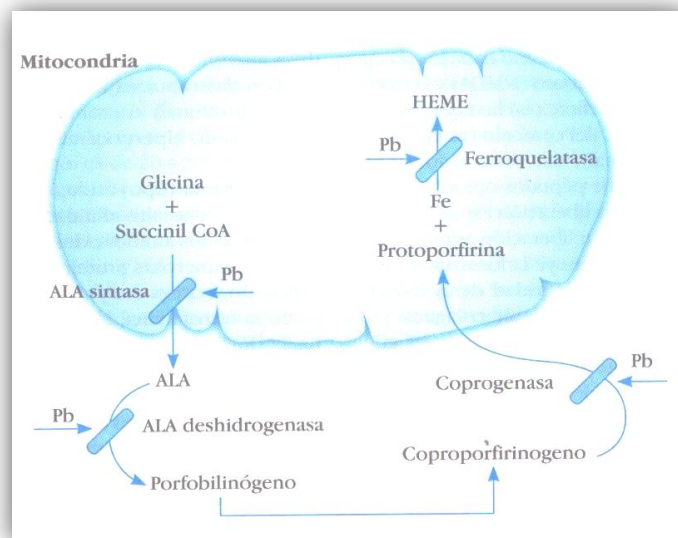


FIGURA 3 Enzimas inhibidas por el plomo en la síntesis del grupo hemo
Fuente: (Peña, 2010)

2.2.3 ALTERACIONES INMUNOLÓGICAS POR TOXICIDAD

2.2.3.1 INMUNIDAD INNATA

La inmunidad innata representa la primera línea de defensa del cuerpo contra las infecciones, sus mecanismos ya existen desde antes del primer encuentro con los microorganismos y está constituida por mecanismos de defensa celulares y bioquímicos preparados para responder con rapidez ante cualquier amenaza. Estos mecanismos sólo reaccionan frente a microorganismos o células dañadas que deben ser reemplazadas por células nuevas funcionales; comprende los siguientes componentes: **1)** Barreras físicas y químicas como la piel, el vello nasal, secreción lacrimal, enzimas salivales, mucosas y cera

ótica. **2)** Células fagocíticas como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y células citolíticas como los linfocitos NK. **3)** Proteínas sanguíneas mediadoras de la inflamación y factores de complemento. **4)** Proteínas denominadas citocinas que regulan las actividades de las células de la inmunidad innata. (Abbas, 2012)

Uno de los mecanismos que utiliza la inmunidad innata es la fagocitosis mediada por células con capacidad de capturar o “engullir” un microorganismo con finalidad de eliminarlo con ayuda de sus enzimas líticas o digestivas y otras moléculas tóxicas. En este proceso las células fagocíticas primero son atraídas hacia el foco de infección mediante señales químicas, una vez ubicadas en el sitio de acción reconocen los microorganismos mediante mecanismos moleculares como receptores de membrana para identificar moléculas específicas presentes sólo en las bacterias y las engullen para finalmente eliminarlas, algunos fagocitos se unen directamente a las bacterias y otras bacterias son previamente opsonizadas por proteínas séricas. El proceso de la fagocitosis se muestra a continuación en la **Figura 4**. (Abbas, 2012)

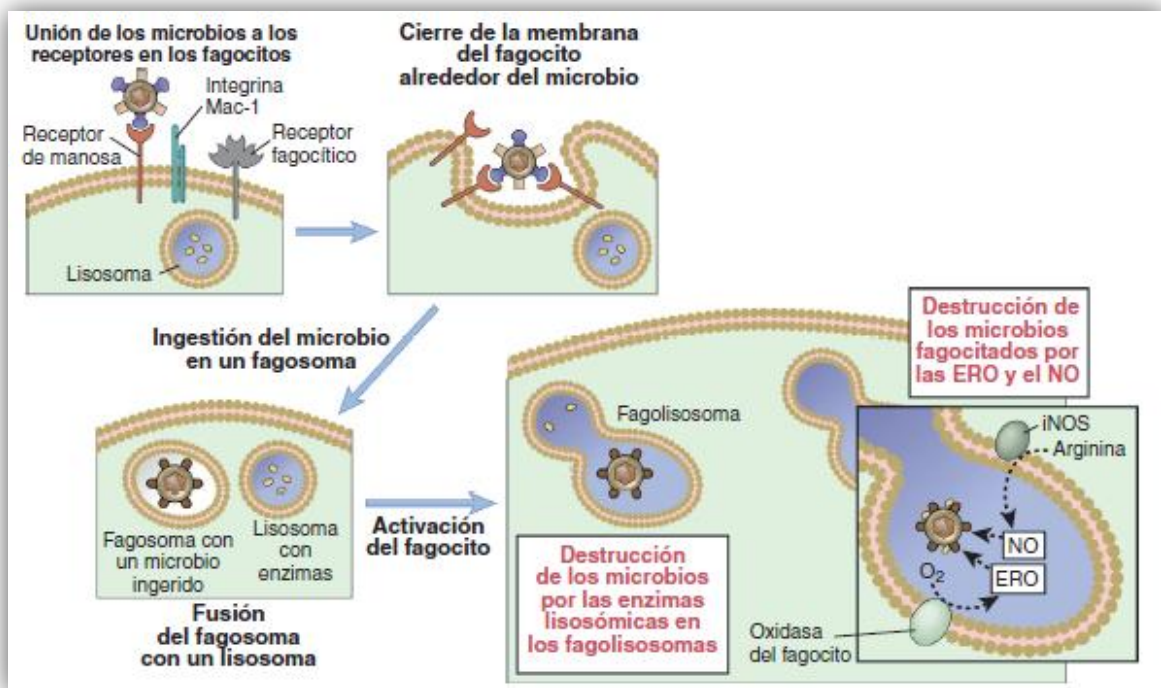


FIGURA 4 Proceso de la fagocitosis
Fuente: (Abbas, 2012)

Las células fagocíticas son parte de la primera línea de defensa celular del sistema inmunológico por lo que, si éstas se ven afectadas de alguna manera, se presentan cuadros que reflejan la deficiencia en su actividad y producción; esto vuelve a las personas más susceptibles a infecciones y enfermedades de tipo bacteriano, micótico o parasitario.

La similitud química del plomo con el calcio permite que este interfiera en diversas vías metabólicas en la mitocondria y en sistemas de segundos mensajeros que regulan el metabolismo energético. Para la serie eritroide, la exposición al plomo produce un punteado basófilo que indica una agregación anormal de ribosomas e interfiere en la síntesis de porfirina, precursor clave en la síntesis de hemoglobina. Para la serie mieloide, el plomo provoca una maduración acelerada de los neutrófilos, produciendo hipersegmentación y granulación tóxica (Ver **Figura 5**), incapacitando a los PMN para cumplir con sus funciones normales. (Molina & Rondón, 2012)

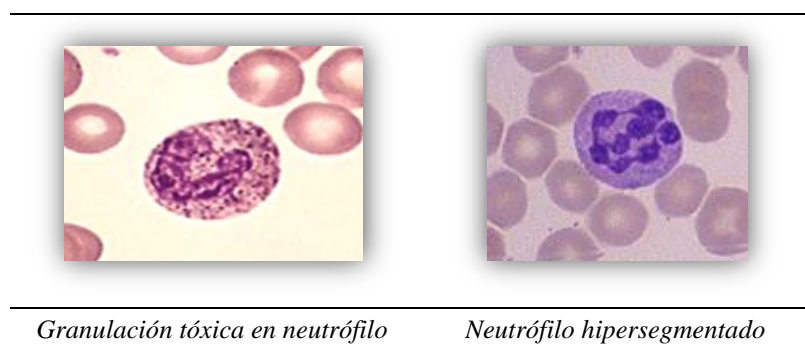


FIGURA 5 Anormalidades en leucocito neutrófilo

Fuente: (Centro de Formación San José de Calasanz, 2010)

2.2.3.2 LA INMUNIDAD ADQUIRIDA

La Inmunidad adquirida a diferencia de la innata, es estimulada en respuesta a la exposición a microorganismos infecciosos y crece en su capacidad defensiva a medida que se enfrenta sucesivamente con el mismo microorganismo. Tiene dos características importantes la primera es ser específica frente a una gran cantidad de diferentes moléculas y microorganismos por muy afines que sean y la segunda su capacidad de memoria frente a las exposiciones repetidas de un mismo microorganismo para responder con más fuerza. Los principales componentes de la inmunidad adquirida son los linfocitos y sus productos

de secreción, los anticuerpos, que son específicos para atacar a las sustancias que suscitan la respuesta conocidos como antígenos. (Abbas, 2012)

Los anticuerpos, conocidos también como inmunoglobulinas son glucoproteínas secretadas por los linfocitos B y sirven para combatir agentes infecciosos o compuestos que son reconocidos como extraños al cuerpo. Todos los anticuerpos poseen las mismas características estructurales básicas, pero difieren en la porción que se une a cada antígeno, esta particularidad les confiere especificidad frente a cada antígeno; además son las principales mediadoras de la inmunidad adquirida frente a microorganismos.

Las inmunoglobulinas pueden ser de cinco tipos según su estructura y función: IgA, IgD, IgE, IgG, o IgM; la IgA se encarga de la inmunidad en las mucosas respiratorias, digestivas, mientras que la IgG es la de memoria y se encarga también de la opsonización y la activación del complemento (estos dos procesos son indispensables frente a antígenos bacterianos). (Abbas, 2012)

Estudios han demostrado un aumento de los niveles anticuerpos en un grupo de trabajadores expuestos al plomo que tenían niveles de plomo sanguíneo mayor al límite de seguridad aceptado de 10 mg/dL. El aumento en el nivel de anticuerpos en suero se debe a que el plomo puede influir en la diferenciación de las células B en células plasmáticas, amplificando así la expansión clonal de células B a secretar anticuerpos. Se considera que la baja exposición al plomo ejerce efectos inmunoestimulantes, en contraste, la alta exposición conduce a estados de inmunosupresión encontrando niveles bajos de: complemento C3, de IgM, IgG e IgA en los trabajadores expuestos al plomo con una correlación lineal negativa entre la IgA y los niveles de plomo en sangre. (Mishra & Chauhan, 2006)

Las inmunoglobulinas pueden cuantificarse por nefelometría. Para ello, el suero incógnita deberá ser incubado con exceso del anticuerpo específico (anti-IgG o anti-IgA según el análisis) a fin de que se produzca la formación de complejos inmunes. Esta técnica, es un método óptico que cuantifica la luz dispersada por los complejos inmunes formados, la cual es proporcional a la concentración del anticuerpo medido. (Sordelli & FMED, 2010)

2.2.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS

2.2.4.1 BIOMETRIA HEMÁTICA AUTOMATIZADA

La biometría hemática es una prueba de rutina muy importante que nos brinda información acerca de las células presentes en la sangre, glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas. En la actualidad los equipos automatizados realizan, calculan y arrojan resultados de varios parámetros hematológicos tales como: cantidad total de células según su población, diferencial absoluto y relativo de glóbulos blancos, volúmenes corpusculares celulares, concentración de hemoglobina, entre otros (Henry, 2012). La interpretación de estos resultados indica cuál es el estado de salud general de una persona. Las diversas técnicas que pueden aplicar los equipos hematológicos pueden estar combinadas para garantizar una mejor identificación de cada población celular y son las siguientes:

a) Citometría de flujo

Es una técnica que mide algunas propiedades de células que están en suspensión y moviéndose en un medio fluido. Todas estas células pasan de forma individual por un punto de medida donde son interceptadas por un haz de luz emitida por un láser de argón. Mientras esto sucede, se puede hacer la medición simultánea de múltiples características físicas de una sola célula gracias impulsos de luz transmitida, estos impulsos de luz se dirigen mediante lentes y se enfocan en tubos fotomultiplicadores que emiten una señal análoga, la misma que es empleada por un sistema informático para su cuantificación. La ventaja analítica de la citometría de flujo tiene como base la habilidad de hacer mediciones cuantitativas y multi-paramétricas en un número estadísticamente adecuado de células para definir las propiedades de una población celular o de las subpoblaciones que la componen, por esto es ampliamente utilizada en equipos hematológicos automatizados. (Henry, 2012)

b) Impedancia

Los analizadores hematológicos automatizados que utilizan el principio de impedancia permiten determinar la concentración de varios tipos celulares basado en el reconocimiento

de dichas células cuando estas atraviesan un punto de medida por el que pasa una corriente eléctrica continua, cuando las células pasan por el punto de medida generan cambios en la resistencia eléctrica, estos impulsos se registran permitiendo la identificación de las células. Así, el número de impulsos equivale a la cantidad de células y la intensidad del impulso al tamaño. Los equipos hematológicos en la actualidad combinan varias tecnologías para una mejor identificación combinando por ejemplo conductividad, citometría de flujo y densidad óptica. (Henry, 2012)

c) Anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos (citometría fluorescente)

En los últimos años los métodos de detección de algunos contadores hematológicos han acoplado técnicas de inmunología, estas técnicas combinan la dispersión de luz con la emisión de fluorescencia similar a los citómetros de flujo convencionales solo que previamente marcan las estructuras celulares con anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos. La interacción de haz láser con cada célula marcada produce 2 tipos de señales: de dispersión y de fluorescencia y serán medidas por varios detectores de dispersión y fluorescencia lo que permite un análisis multiparamétrico por cada célula. (Henry, 2012)

2.2.4.2 ESTUDIO DE PLACA

El estudio de placa sanguínea es parte importante de la evaluación hematológica, se basa en la tinción de un extendido sanguíneo sobre una placa de vidrio con coloraciones especiales y la posterior observación microscópica por un analista para identificar características morfológicas anormales en los elementos figurados y revelar pequeños detalles que se pasan por alto o no pueden ser evaluados por un equipo hematológico automatizado. Algunos de estos detalles pueden ser anomalías leves en la forma de los eritrocitos, inclusiones celulares, presencia de granulaciones tóxicas en glóbulos blancos o rojos, células hipo o hipersegmentadas y células inmaduras. (Henry, 2012)

a) **Tinción Wright**

La tinción de Wright es una coloración usada en histología y hematología para facilitar la diferenciación de células sanguíneas; tiñe diferencialmente la mayoría de estructuras normales y anormales de la célula; está compuesta de dos colorantes principales, un colorante ácido y una mezcla compleja de colorantes básicos conocidos como tiacinas que incluyen azul de metileno, además de metanol y una solución buffer o tampón.

Estos dos colorantes tiñen de acuerdo a su interacción química con los componentes de la célula, el azul de metileno tiñe de color azul las partes ácidas de las células como el núcleo de los leucocitos mientras que la eosina tiñe las partes alcalinas como el citoplasma; estos dos colorantes están disueltos en metanol que permite la fijación de las células a la placa de vidrio, y el buffer de fosfatos rehidrata a las células después de la exposición con metanol. (Henry, 2012)

2.2.4.3 NEFELOMETRÍA

La nefelometría es un método útil para medir la concentración de partículas en solución que contiene partículas como los anticuerpos. En este método se mide la dispersión de luz gracias a un detector que no está en el camino directo del haz luminoso, cuando la luz pasa a través de una solución se dispersa en relación a la cantidad, tamaño y forma de las partículas, entre mayor sea la cantidad de las partículas y mayor sea su tamaño más se dispersará la luz a partir de su posición original, esta cantidad de luz es medida por el detector. (Henry, 2012)

Las mediciones nefelométricas son más adecuadas para medir muestras cuya concentración de partículas es baja, lo que da lugar a una débil dispersión de la luz. Los métodos nefelométricos permiten detectar partículas extremadamente pequeñas en solución y detectar los estadios muy precoces de la agregación molecular. (Sordelli & FMED, 2010)

2.2.4.4 ENSAYO FAGOCÍTICO

Este ensayo evalúa la función fagocítica de las células del sistema inmune, es decir evalúa su capacidad de fagocitar y de provocar el estallido respiratorio, dependiente de la enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) Oxidasa. Para este ensayo se le extrae sangre al paciente y se realiza un procedimiento de separación de las células polimorfonucleares (en su mayoría neutrófilos). A estas células se les agrega una proporción de bacterias (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) según la cantidad de neutrófilos aislados y se coloca suero del paciente para potenciar la fagocitosis. Esta solución se incuba a 37°C y se extraen muestras a intervalos de 30 minutos durante 2 horas. Estas muestras son sembradas en agar sangre e incubadas durante toda la noche a 37°C. Esto permite que las bacterias crezcan y formen colonias visibles. Así, se cuenta el número de colonias para cada tiempo de extracción y se grafica el n° de colonias vs tiempo. Es de esperar que a medida que el tiempo de incubación es mayor, el número de colonias sea menor porque las células del paciente fagocitan a las bacterias y, por lo tanto, cada vez hay menos bacterias. (Sordelli & FMED, 2010)

2.3 MARCO CONCEPTUAL

Sistema inmune: conjunto coordinado de mecanismos de defensa del cuerpo humano contra microorganismos, sustancias extrañas y células propias anómalas. (Abbas, 2012)

Eritrocito: célula anucleada de forma discoide cuya principal función es transportar nutrientes y oxígeno a todo el organismo y también eliminar dióxido de carbono. (Medmol, 2008)

Polimorfonuclear (PMN): son leucocitos que tienen un núcleo con forma irregular, lobulada y polimórfica. (Henry, 2012)

Plomo: elemento químico que puede formar sales tóxicas, con efectos adversos sobre el cuerpo humano. (OMS, Organización Mundial de la Salud, 2014)

Benceno: hidrocarburo aromático, incoloro y derivado del petróleo; altamente inflamable y tóxico, cuya exposición prolongada afecta a la médula ósea y sistema inmune. (Peña, 2010)

Fagocitosis: proceso por el cual las células del sistema inmune engullen y degradan microorganismos, células patógenas o muertas y partículas extrañas. (Decs, 2014)

Microbicida: sustancia que provoca la pérdida total de viabilidad en un microorganismo, causándole muerte o inactivación irreversible. (Murray, 2009)

Inmunoglobulina: proteína sintetizada por las células plasmáticas del sistema inmune, presente en sangre periférica y en otros fluidos biológicos para reconocer a otras moléculas con alta afinidad y formar complejo estable, actuando en la inmunidad contra sustancias extrañas al cuerpo. (Abbas, 2012)

Signo: cualquier manifestación medible y consecuente a una enfermedad o alteración de la salud y que se hace evidente en la biología del enfermo. (EUSAL, 2008)

Síntoma: es la referencia subjetiva de una enfermedad solo percibida por el paciente, como un cambio que reconoce como anormal, o causado por un estado patológico o enfermedad. (EUSAL, 2008)

Células B: son linfocitos que están diseñados para proporcionar inmunidad al individuo generando anticuerpos cuando se exponen a antígenos, sustancias que provocan una respuesta inmune. (Abbas, 2012)

Opsonización: fenómeno en el que anticuerpos conocidos como opsoninas se adhieren a la superficie de un microorganismo haciendo que sea más eficientemente fagocitado. (Murray, 2009)

EDTA: es una solución de sales de sodio y potásicas que actúa como anticoagulante ya que inhibe la participación del Calcio en la coagulación de la sangre. (González, 2010)

Cepa ATCC: son microorganismos con material biológico certificado, del cual se ha realizado pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares para certificar que es un cultivo puro y conserva ciertas características específicas. (ROMERO, 2010)

Hipersegmentado: anomalía de las células polimorfonucleares en la que presentan mayor número de lobulaciones de lo normal y está asociado a diferentes enfermedades crónicas. (Henry, 2012)

Granulación tóxica: presencia de gránulos primarios de color azul oscuro anormalmente grandes en leucocitos, adquirida en respuesta al estrés causado por un cuadro inflamatorio, infeccioso y otras condiciones tóxicas. (Henry, 2012)

Punteado basófilo: presencia de gránulos basófilos irregulares, finos o gruesos de color azul oscuro dentro del eritrocito, característico de la intoxicación por plomo u otras enfermedades con síntesis defectuosa de hemoglobina. (Henry, 2012)

Célula Citolítica: tipo de célula inmunitaria que tiene la capacidad natural de destruir ciertas células tales como: las reconocidas como extrañas, las cancerosas o infectadas por virus o bacterias intracelulares. (Abbas, 2012)

Solución buffer o tampón: es una solución que reduce el impacto de los cambios drásticos de pH manteniéndolo constante cuando se agregan pequeñas cantidades de ácidos (H^+) o bases (OH^-), o se diluya la solución. (Cedrón & Landa, 2011)

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1 TIPO DE ESTUDIO

Este es un estudio de tipo observacional descriptivo y transversal, que se enfoca en la descripción y reporte de frecuencias de las posibles alteraciones en el sistema inmune y hematológico de un grupo de individuos expuesto a elementos tóxicos de la gasolina.

3.2 TIPO DE MUESTREO

El muestreo es de tipo aleatorio simple, en el que se sortearon gasolineras y trabajadores al azar con ayuda del programa en línea Randomizer (Ver Figura 6). Todos los despachadores de combustible de las gasolineras existentes en la ciudad de Quito tienen la misma probabilidad de ser seleccionados para participar en el estudio. Sin embargo, los participantes deberán cumplir los criterios de inclusión, superar los de exclusión y estar dispuestos a participar en el estudio.

3.3 TAMAÑO DE MUESTRAL

Ya que se sabe el número total de gasolineras activas (95) en la ciudad de Quito, se utilizará la fórmula de población finita para calcular el total de estaciones de servicio que se tendrán que encuestar para saber cuántos trabajadores laboran con el cargo de despachadores de combustible en las gasolineras sorteadas. (Fernández, 2010)

$$n = \frac{N * Z_n^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + Z_n^2 * p * q}$$

$$n = \frac{95 * 1.96^2 * 0.05 * 0.95}{0.05^2 * (95 - 1) + 1.96^2 * 0.05 * 0.95}$$

$$n = \frac{17.335}{0.235 + 0.1825} = 41 \text{ gasolineras}$$

Donde:

- N= Total de la población
- $Z_n^2 = 1.96^2$ (cuando la seguridad es del 95%)
- p= proporción esperada (5%, 0.05)
- q= 1-p (en este caso 1- 0.05 = 0.95)
- d = precisión (en este caso deseamos un 5%)

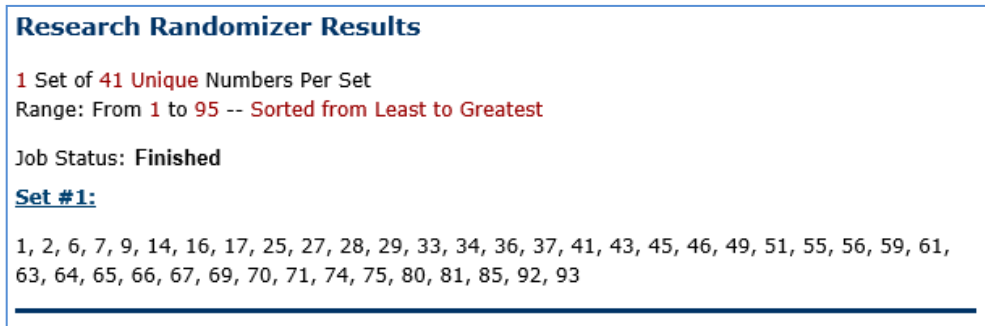


FIGURA 6 Selección de gasolineras al azar. (Detalladas en ANEXO 1)
Fuente: Chávez Diego y Poveda Adrián. Captura de datos desde RANDOMIZER

Se acudió a cada una de las gasolineras seleccionadas al azar para realizar encuestas a los empleadores y trabajadores, y así conocer la cantidad de despachadores de gasolina activos, sus condiciones de trabajo, vivienda y hábitos. Finalmente se supo que había un total de 182 despachadores en las 41 estaciones de servicio. A esta población de trabajadores se le aplicó nuevamente la fórmula de población finita para obtener un tamaño muestral final de 52 trabajadores.

$$n = \frac{N * Z_n^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + Z_n^2 * p * q}$$

$$n = \frac{182 * 1.96^2 * 0.05 * 0.95}{0.05^2 * (182 - 1) + 1.96^2 * 0.05 * 0.95}$$

$$n = \frac{33.211}{0.635} = 52 \text{ trabajadores}$$

- Donde:
- N= Total de la población
 - $Z_n^2 = 1.96^2$ (cuando la seguridad es del 95%)
 - p= proporción esperada (5%, 0.05)
 - q= 1-p (en este caso 1- 0.05 = 0.95)
 - d = precisión (en este caso deseamos un 5%)

Decisión: con un nivel de confianza del 95% y un error alfa de 0,5 se establece un total de 52 muestras de despachadores de gasolina para el estudio hematológico e inmunológico. Sin embargo, para fortalecer el tamaño muestral, se tomó en cuenta a todos los despachadores de las gasolineras visitadas pero que igualmente cumplieron con los criterios de inclusión y superaron los de exclusión que se determinaron para este estudio. El número total asciende entonces a muestras de 61 despachadores.

Criterios de inclusión: para este estudio se tomaron en cuenta a los siguientes trabajadores:

- Hombres y mujeres que estén trabajando como despachadores de combustible dos años seguidos o más.
- Que hayan aceptado participar voluntariamente en el estudio.
- Que hayan leído y firmado el consentimiento informado.

Criterios de exclusión: los individuos con las siguientes condiciones no pudieron participar en el estudio:

- Que vivan cerca de florícolas; fábricas o sitios donde se opere con pesticidas, aerosoles, benceno, pinturas, disolventes, lacas o barnices.
- Que hayan trabajado en algún momento de su vida en: minería, fábricas de manufactura o reparación de baterías; manipulación con disolventes, pinturas, barnices, aerosoles, lacas, benceno, pesticidas o metales pesados.
- Que sea fumador activo.
- Que hayan consumido bebidas alcohólicas hasta 5 días antes de la toma de la muestra o más de 50 gramos de alcohol que equivalen a 2 cervezas de 750 mL c/u o 175 mL de ron, vodka o aguardiente (1/4 de botella) hasta 3 días antes.
- Que tengan alguna enfermedad alérgica o inmune.
- Que tengan alguna enfermedad hepática.
- Que sufran intolerancia a la glucosa en ayunas o diabetes mellitus 1 ó 2.
- Que estén consumiendo fármacos inmunosupresores, antiinflamatorios, antibióticos y/o medicamentos que contengan corticoides.
- Que hayan tenido una enfermedad viral o bacteriana los últimos dos meses previos a la toma de la muestra.
- Que hayan recibido vacunas en los últimos 6 meses previos a la toma de la muestra.

3.4 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Variable	Definición de la variable	Dimensión	Indicadores		Valores de referencia	# Pregunta en encuesta o instrumento.	Tipo de variable		
Condiciones Socio-demográficas y laborales	Comprende el sexo, la edad, los años totales de exposición, equipos de protección y carga laboral semanal.	Sexo	Hombre/Mujer		FA	-	ET 1	Cualitativa	
		Edad	Años				ET 2	Cuantitativa	
		Años exposición	Años				ET 4		
		Trabajo semanal	Horas				ET 5, 6, 7; EE 2, 3		
Alteraciones hematológicas	Se entiende por alteración hematológica a los cambios en: el tamaño, forma, y cantidad de los elementos figurados sanguíneos; las concentraciones de hemoglobina y hematocrito; la presencia de hipersegmentados neutrófilos, inclusiones anormales en células sanguíneas y células inmaduras en sangre periférica.	Contajes de elementos figurados.	Eritrocitos (c/ $\mu\text{L} \times 10^6$) Leucocitos (cel./ $\mu\text{L} \times 10^3$) Neutrófilos (K/ μL) Linfocitos (K/ μL) Monocitos (K/ μL) Eosinófilos (K/ μL) Basófilos (K/ μL) Plaquetas (cel./ $\mu\text{L} \times 10^3$) Hematocrito (%)	Eritropenia/Normal/Eritrocitosis Leucopenia/Normal/Leucocitosis Neutropenia/Normal/Neutrofilia Linfopenia/Normal/Linfocitosis Monocitopenia/Normal/Monocitosis Eosinopenia/Normal/Eosinofilia Normal/Basofilia Plaquetopenia/Normal/Trombocitosis Bajo/Normal/Alto	FA FR (%)	3.9 – 6.5 4.4 – 11.3 2.99 – 5.23 1.30 – 2.90 0.30 – 0.80 0.02 – 0.54 0.00 – 0.10 150 – 450 38 – 54	Biometría hemática en equipo automatizado PENTRA 60	Cualitativa	
		Nivel de hemoglobina	Hemoglobina (g/dL)	Baja/Normal/Alta		12.6 – 17.4			
		Forma del eritrocito	Poiquilocitosis	Presente / Ausente		Negativo			Estudio de frotis de sangre periférica con tinción Wright
		Inclusiones celulares anormales	Granulación tóxica Punteado basófilo						
		Hipersegmentación	Presente / Ausente						
		Células inmaduras							
Alteraciones inmunológicas	Se refiere a la disminución de la capacidad fagocítica de los PMN y cambios en las concentraciones séricas de inmunoglobulinas A y G.	Actividad fagocítica	Normal / Disminuida (UFC/mL /2h)		FA FR (%)	< 35	Ensayo fagocítico PMN vs <i>S. aureus</i> ATCC 25923	Cualitativa	
		Concentraciones séricas de Ig	IgG (g/L)	Disminuida/Normal/Aumentada		7.0 – 16.0	Cuantificación por nefelometría en equipo Nephstar SPA	Cualitativa	
			IgA (g/L)	Disminuida/Normal/Aumentada		0.7 – 4.0			

Fuente: Elaborado por Diego Chávez y Adrián Poveda

Código: ET, Encuesta a trabajador; EE, Encuesta a empleador; FA, Frecuencia Absoluta; FR, Frecuencia relativa

3.5 MATERIALES Y MÉTODOS

3.5.1 MATERIALES

3.5.1.1 TOMA DE MUESTRA

- Tubos al vacío BD Vacutainer con EDTA K2 7.2 mg. REF: 367844
- Tubos al vacío Vacuette sin gel con activador de la coagulación. REF: 455092H
- Agujas de extracción multimuestreo 21Gx1” Vacuette. REF: 450072
- Swabs BD con alcohol isopropílico al 70%. REF: 326895
- Cápsula para toma de muestra
- Guantes de nitrilo
- Banditas o curitas
- Torniquete
- Caja para transporte y conservación de muestras.
- Rotulador permanente

3.5.1.2 BIOMETRÍA HEMÁTICA Y ELABORACIÓN DE PLACA

- Contador hematológico ABX Diagnostics® Pentra 60
- Microscopio óptico Leica CME Modelo: 1349521X
- Tubo BD Vacutainer con muestra con EDTA K2 7.2 mg
- Colorante Wright QUIMICAL x 1 litro. Lote: WRIENE1415
- Placas porta objetos
- Placa extensora
- Agitador de tubos
- Aceite de inmersión

3.5.1.3 ENSAYO FAGOCÍTICO

- Solución SIGMA HISTOPAQUE 1.077 g/mL Lot: RNBD7605
- Solución SIGMA HISTOPAQUE 1.119 g/mL Lot: RNBD4310
- Pipetas de volumen variable de: 1 -10 µL / 20 – 100 µL / 100-1000 µL

- Tubo BD Vacutainer con muestra con EDTA K2 7.2 mg
- Tubos cónicos Falcon estériles BOECO Germany Lote 15CA001
- Tubos de ensayo de vidrio estériles de 5 mL
- Cepa *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach ATCC® 25923
- Centrífuga Hettich ROTOFIX 32A
- Incubadora MEMERT In30 a 37°C
- Cajas bipetri listas con agar sangre.
- Colorante azul tripán al 0.4% Mediatech REF: 25-900-CI
- Solución PBS SIGMA-ALDRICH P4417
- Agua destilada estéril
- Asa calibrada de 10 µL
- Cámara de Neubauer
- Cronómetro
- Control positivo y negativo
- Suero del paciente.

3.5.1.4 EVALUACIÓN INMUNIDAD ADQUIRIDA

- Nefelómetro Nephstar® *Specific Protein Analyzer*.
- Cubetas de reacción y agitadores magnéticos para Nefelómetro Nephstar®.
- Pipeta automática BIOHIT PPROLINE incluida en el nefelómetro Nephstar®
- Kit de determinación de IgA para Nefelómetro Nephstar® REF: DK001.
- Kit de determinación de IgG para Nefelómetro Nephstar® REF: DK004.
- Diluyente de muestra Nephstar® REF: DK110.
- Centrífuga Hettich ROTOFIX 32A
- Tubos de vidrio de 5 mL
- Tubos Eppendorf de 1 mL
- Suero del paciente.
- Parafilm “M”

3.6 PROCEDIMIENTO

El estudio se realizó en tres fases:

3.6.1 FASE UNO: CRIBAJE DE LA POBLACIÓN

- Selección aleatoria de las gasolineras participantes mediante el uso del programa en línea RANDOMIZER. (ANEXO 1)
- Visita a las gasolineras que salieron sorteadas, entrega de las cartas de presentación a los administradores (ANEXO 2) y recolección de información sobre la estación de servicio mediante una encuesta al empleador. (ANEXO 3)
- Recolección de información socio-laboral, condición de salud y hábitos del despachador de gasolina mediante una encuesta. (ANEXO 4)
- Selección de los pacientes idóneos para participar en el estudio.

3.6.2 FASE DOS: EXTRACCIÓN DE MUESTRAS

- Contacto con los administradores de las gasolineras para coordinar la fecha y hora de toma de muestras del grupo de despachadores.
- Lectura, llenado y firma de los consentimientos informados por parte de los trabajadores. (ANEXO 5)
- La recolección de muestras se realizó a partir del 04 de marzo hasta el 14 de abril de 2016 y se tomaron muestras de sangre en dos tubos de 4 mL c/u con EDTA K2 7.2 mg y uno de 9 mL sin gel separador con acelerador de la coagulación.
- Las muestras fueron debidamente rotuladas, guardadas en una caja de transporte y conservación de muestras en frío y llevadas a los laboratorios de la PUCE.

3.6.3 FASE TRES: ANALISIS DE MUESTRAS

3.6.3.1 BIOMETRÍA HEMÁTICA

Para el examen de la biimetría hemática automatizada en el equipo ABX Diagnostics® Pentra 60 y elaboración del frotis sanguíneo con tinción Wright, se entregó un tubo de 4 mL con EDTA K2 7.2 mg al laboratorio DISERLAB de la PUCE. Los resultados se entregaron el mismo día del examen.

3.6.3.2 ELABORACIÓN DEL FROTIS SANGUÍNEO

Procedimiento:

1. Rotular la placa portaobjetos con los datos del paciente.
2. Colocar una gota de sangre con anticoagulante a 1cm del final de la placa.
3. Extender la gota con una placa de filos esmerilados en un ángulo de 30° a 45°.
4. La gota extendida debe tener una forma de “lengua” y una capa fina de sangre.
5. Dejar secar al aire, no soplar.
6. Cubrir el extendido sanguíneo con el colorante Wright durante 3 minutos.
7. Colocar unas gotas de agua o buffer.
8. Soplar con suavidad para mezclar el colorante y el agua.
9. Dejar reposar la mezcla durante 3 minutos.
10. Lavar la placa con un chorro suave y continuo de agua.
11. Limpiar el anverso de la placa con papel higiénico.
12. Dejar secar la placa al aire en posición vertical.
13. Colocar una gota de aceite de inmersión al final del extendido sanguíneo.
14. Revisar todo el final de la placa con microscopio óptico y lente objetivo de 100x.

3.6.3.3 CUANTIFICACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS

Para la cuantificación de las inmunoglobulinas y el ensayo fagocítico se llevaron y procesaron las muestras en el laboratorio de inmunología y microbiología de la facultad de Bioanálisis de la PUCE. Los sueros sobrantes de cada paciente fueron colocados en tubos eppendorf de 1 mL, rotulados, cubiertos con parafilm “M” y almacenados a -20°C.

Procedimiento:

1. La cuantificación de inmunoglobulinas IgG e IgA se realizó mediante el método de nefelometría cinética en el nefelómetro Nephstar® *Specific Protein Analyzer*. Los procedimientos específicos están detallados en el **(ANEXO 6)**.

3.6.3.4 ENSAYO FAGOCÍTICO

Procedimiento para la separación, purificación y viabilidad de PMN:

a) Separación de PMN:

1. El aislamiento de PMN se realizó con Histopaque -1119 e Histopaque -1077 de SIGMA-ALDRICH®. El procedimiento específico se encuentra detallado en el (ANEXO 7)

b) Purificación de PMN:

1. Añadir 5 mL de solución PBS al tubo que contiene los granulocitos.
2. Centrifugar durante 10 minutos a 200 g.
3. Retirar 3 mL de la solución PBS y resuspender suavemente el sedimento.
4. Determinar la cantidad de granulocitos aislados con la ayuda de un contador hematológico o cámara de Neubauer. La cantidad de PMN debe ser mayor al 80% del total de células cuantificadas. Esto indica el grado de pureza del aislado.
5. Registrar la cantidad absoluta de neutrófilos/mL en el tubo.
(SIGMA, 2002)

a) Viabilidad de los PMN:

1. Tomar 20 μ L de la solución con granulocitos y colocar en un tubo de 1 mL
2. Añadir 180 μ L de solución azul tripán al 0.4%.
3. Homogenizar suavemente para mezclar bien las soluciones.
4. Tomar 10 μ L de la solución final y colocar en la cámara de Neubauer.
5. Observar al microscopio con lente objetivo de 40x.
6. Contar 100 células; Las que no se colorean son células viables, las coloreadas de azul/celeste son células muertas.
7. Registrar el porcentaje de células viables y muertas (adecuado >96% viables).
(Espinoza & Gómez, 2000)

Procedimiento para el ensayo fagocítico:

a) Preparación de materiales:

1. En un tubo de 10 mL estéril preparar 1 mL de solución 0.5 McF de *S. aureus* ATCC 25923. (Esta contiene 1.5×10^8 UFC/mL)
 - a. Añadir 4 mL de agua destilada estéril y agitar. (se necesita diluir la solución bacteriana para pipetear más fácilmente la cantidad necesaria de bacterias y realizar el enfrentamiento en la proporción establecida).
2. Rotular 2 cajas bipetri de agar sangre con los datos del paciente y fecha.
3. Rotular al reverso de la caja bipetri, en un lado 30' y al otro 60'.
4. En la otra caja bipetri rotular 90' y 120'
5. Calcular el número de bacterias que se deben enfrentar, según la cantidad de PMN obtenidos del paciente. La relación PMN/bacteria es de (1:10).

Ejemplo: Si tenemos una solución de 1000 PMN/ μ L, entonces se deberá tomar 10000 UFC de la solución 0.5McF diluida 1:5.

b) Enfrentamiento:

1. Agregar 1 mL de los PMN aislados del paciente en un tubo de 5 mL
2. Tomar la cantidad necesaria calculada de bacterias y añadirla por pipeteo.
3. Añadir 100 μ L de suero del paciente. (Opsonización)
4. Agitar suavemente e introducir el tubo en una incubadora a 37°C.

c) Inoculación y siembra:

1. Inmediatamente después de 30 minutos, sacar el tubo, agitarlo suavemente y tomar con una aza calibrada de 10 μ L una cantidad de solución y sembrar en la sección de 30' de la caja bipetri.
2. La siembra se hará en forma de cuadrantes (3) con 1cm de inóculo o con el método para urocultivos.
3. Guardar el tubo de "enfrentamiento" nuevamente en la incubadora
4. Repetir los pasos 5 al 7 hasta llegar a los 120 minutos.
5. Dejar las cajas bipetri en incubación a 37°C por 24h.

b) Contaje de colonias sobrevivientes:

1. Contar y registrar las colonias formadas

- Si se sembró en cuadrantes: en cada sección del segundo y tercer cuadrante (el sitio de inóculo y el primer cuadrante son obviados).
- Si se sembró como urocultivo: en ambos lados del inóculo vertical.

b. Posiblemente en la sección de 30 minutos las colonias sean todavía demasiadas que no permita su contaje. En ese caso se registra: ≥ 1000 UFC/mL (Atosuo & Lilius, 2011)

3.7 CONTROL DE CALIDAD

3.7.1 Control de calidad de la biometría hemática automatizada

En el laboratorio DISerLAB de la PUCE se utilizaron controles internos y externos que aseguran la confianza de los resultados entregados. Los controles internos estos controles se corren a diario antes de iniciar una corrida analítica con muestras de pacientes y el control externo se analiza trimestralmente.

Para los controles internos se usan 3 niveles (bajo, normal y alto) de la marca HORIBA Medical ABX SAS, idóneos para monitorear los parámetros de medición del equipo ABX Diagnostics® Pentra 60. Mientras que para el control externo se utiliza un solo nivel de la marca BIORAD. Los criterios de validación de los parámetros de los controles, así como una copia del reporte de estos se encuentran en el (ANEXO 8).

3.7.2 Control de calidad del frotis sanguíneo

Cada vez que se entregó un grupo de pacientes expuestos para el procesamiento de la biometría hemática al laboratorio DISerLAB de la PUCE se añadían pacientes que no realizan trabajo como despachadores de gasolina. En ambos tipos de pacientes no se observó precipitado en la coloración, las células se encontraban bien distribuidas y completas y las estructuras bien coloreadas; todo esto permitió una buena observación y estudio del frotis sanguíneo. Todos los frotis sanguíneos fueron realizados y coloreados por

la misma analista, con los mismos tiempos de reacción y con el mismo frasco del mismo lote de colorante Wright.

3.7.3 Control de calidad de la cuantificación de las inmunoglobulinas

El nefelómetro Nephstar® *Specific Protein Analyzer* tiene un sistema de calibración por medio de una tarjeta magnética, la cual almacena los datos de la curva testeados en fábrica para el lote específico del kit en el que se incluye. Esta calibración se realiza con el material de referencia internacional CRM470 para proteínas séricas.

Cada kit contiene un frasco para realizar el control de calidad de las mediciones que realiza el nefelómetro. Antes de empezar una corrida analítica con las muestras de pacientes se analizaron primeramente y validaron los controles. Ninguna de las reglas de Westgard consideradas para un nivel de control fue violada por lo que podemos asegurar que las concentraciones mediadas son confiables. Las tablas y gráficas del monitoreo de la técnica se encuentran en el (ANEXO 9)

3.7.4 Control de calidad del ensayo fagocítico

Para asegurar el rendimiento y confianza de los resultados del ensayo, cada vez que se procesaron muestras de pacientes se realizó lo siguiente:

- Análisis de pureza del aislado de PMN.
- Determinación de la viabilidad celular.
- Siembra y aislamiento de la cepa ATCC 25923 *S. aureus*

Control positivo: realizar el procedimiento con PMN aislados de un paciente sano.

Control negativo 1: realizar el procedimiento con PMN aislados de un paciente con: Diabetes mellitus tipo 1 ó 2, nefropatía crónica, quemaduras extensas o alcohólico crónico. **Control negativo 2:** realizar el procedimiento con 1 mL de agua destilada estéril en sustitución de los PMN. (Williams & Marshall, 2005)

Los resultados y fotos de los controles procesados se encuentran en el (ANEXO 10).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 DATOS SOCIO-LABORALES

Para el presente estudio se acudió a 41 gasolineras del distrito metropolitano de Quito y de los 182 trabajadores que tienen el cargo exclusivo de despachadores de gasolina en dichas gasolineras se pudo encuestar a 135. De los pacientes encuestados, se analizaron muestras de 61 despachadores (51 Hombres y 10 mujeres) que pertenecen a 8 estaciones de servicio. El número final de pacientes participantes corresponde a los que cumplían los criterios de inclusión, superaron los de exclusión y desearon participar voluntariamente en el proyecto, los datos socio-laborales se encuentran detallados en la **Tabla 1** y **Gráfico 1**. Las muestras fueron recolectadas a partir del 04 de marzo hasta el 14 de abril de 2016.

TABLA 1.

Datos socio-laborales de los trabajadores participantes

DATOS	UNIDAD	$\bar{X} \pm SD$	RANGO	
			MENOR	MAYOR
Edad	Años	36.4 ± 9.7	22.0	62.0
Tiempo de exposición	Años	8.7 ± 6.0	2.0	29.8
Carga laboral semanal	Horas	44 ± 4	40	48

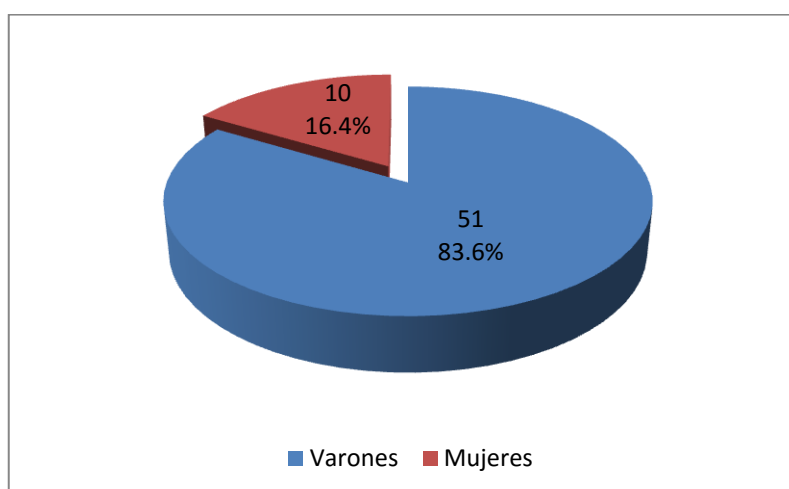


GRÁFICO 1. Despachadores de gasolina participantes por género

Adicionalmente, gracias a la encuesta aplicada a los empleadores y despachadores de gasolina de todas las 41 estaciones de servicio visitadas, se pudo obtener información sobre el ambiente laboral y el interés respecto a la salud de la población estudiada en este proyecto. Esta información se encuentra detallada en la **Tabla 2**; Es interesante notar que un gran porcentaje de los empleadores de las gasolineras visitadas no desearon que se les realice exámenes a sus trabajadores o consideran que las actividades que realizan sus despachadores de gasolina no representan peligro para su salud.

TABLA 2.

Ambiente laboral de los despachadores de las estaciones de servicio encuestadas

DATO	GASOLINERAS* CON:							
Turnos de trabajo	8 horas	27%	12 horas	61%	24 horas	12%		
Tipo de turno	Fijos	0%	Rotativos	100%				
Kit entregado/recibido**	Uniforme	100%	Botas	100%	Guantes	100%	Mascarilla	100%
EMPLEADORES								
¿Considera que las actividades que realizan sus trabajadores durante su turno, son de riesgo para su salud?					SI	81%	NO	19%
¿Le gustaría que hagamos exámenes de laboratorio gratuitamente a sus empleados, a fin de determinar cómo se encuentra su salud?					SI	76%	NO	24%

* Los porcentajes están calculados en base al total de gasolineras visitadas = 41

**En cuanto a los equipos de protección personal que entregan los empleadores, el 100% de los despachadores acuerda recibirlos todos. Sin embargo, ninguno de ellos usa la mascarilla y guantes durante su turno de trabajo.

4.1.1 ALTERACIONES HEMATOLÓGICAS

4.1.1.1 CONTAJES CELULARES

En el conteo de glóbulos rojos no se evidenció eritropenia en ninguno de los despachadores y solamente uno presentó eritrocitocis que corresponde al 1,6% del total. El resto de trabajadores, es decir el 98.4% (60) evidenciaron un conteo de eritrocitos dentro del valor de referencia, con una media de 5.49 ± 0.46 (M/ μ L).

En cuanto al contaje de glóbulos blancos, el 4,9% (3) de los trabajadores presentaron leucopenia, el 93.5 % (57) tuvo un contaje normal con un promedio de 6.6 ± 1.3 (K/ μ L) glóbulos blancos y únicamente el 1,6% (1) tuvo leucocitosis.

En la **Tabla 3** se presentan resumidos estos resultados.

TABLA 3.

Frecuencias de contajes normales y alterados de glóbulos rojos y blancos en despachadores

PARÁMETRO	# CASOS	# CASOS	TOTAL #	% TOTAL
RESULTADO	HOMBRES	MUJERES	TRABAJADORES	TRABAJADORES
Normal*	51	9	60	98.4
Eritrocitosis	0	1	1	1.6
Normal**	47	10	57	93.5
Leucopenia	3	0	3	4.9
Leucocitosis	1	0	1	1.6

*VR Glóbulos rojos = Hombre 4.50 – 6.50 (M/ μ L); Mujer 3.90 – 5.60 (M/ μ L)

**VR Glóbulos blancos = 4.4 – 11.3 (K/ μ L)

Con respecto al contaje de neutrófilos, el 32,8% (20) de los trabajadores presentaron neutropenia en el contaje absoluto, aunque algunos presentaron valores normales en la fórmula leucocitaria diferencial. El 65,6% (40) de los pacientes tuvieron un contaje de neutrófilos dentro del rango de referencia y solo 1,6% (1) presentó neutrofilia. Ver **Tabla 4**

TABLA 4.

Frecuencias de los contajes normales y alterados de neutrófilos en despachadores

PARÁMETRO	# CASOS	# CASOS	TOTAL #	% TOTAL
RESULTADO	HOMBRES	MUJERES	TRABAJADORES	TRABAJADORES
Normal	31	9	40	65.6
Neutropenia	19	1	20	32.8
Neutrofilia	1	0	1	1.6

Se tomó en cuenta el valor absoluto (**2.99 – 5.23 K/ μ L**) y no el diferencial de la fórmula leucocitaria (**43.0 – 65.0%**).

Los pacientes que tuvieron contajes dentro del valor de referencia tienen un promedio de 3.89 ± 0.63 (K/ μ L) neutrófilos y en conjunto los pacientes con neutropenia tienen un contaje medio de 2.46 ± 0.39 (K/ μ L) neutrófilos. Pero al relacionar los resultados de los pacientes con neutropenia -el resultado más significativo de este parámetro- con el tiempo de exposición a los gases del combustible, se puede notar que existe una relación de tipo inversa entre ellos; a mayor tiempo de exposición, menor contaje de neutrófilos. Estos datos se pueden observar en la **Tabla 5**.

TABLA 5.

Frecuencias de despachadores con neutropenia por tiempo de exposición

TIEMPO DE EXPOSICIÓN (AÑOS)	PACIENTES AFECTADOS TOTAL = 20	NEUTROPENIA K/μL <2.99* $\bar{X} \pm SD$
2.00 – 6.00	9 (45%)	2.51 ± 0.38
6.08 – 10.00	9 (45%)	2.49 ± 0.37
10.08 – 14.00	-	-
14.08 – 18.00	2 (10%)	2.07 ± 0.46
18.08 – 30.00	-	-

*Se tomó en cuenta el valor absoluto del contaje de neutrófilos.

En el contaje de linfocitos, ningún trabajador presentó linfopenia, mientras que el 80,3% (49) tuvo un contaje normal de linfocitos con una media de 2.24 ± 0.41 (K/ μ L) y el 19,7% (12) presentó linfocitosis con un promedio de 3.48 ± 0.50 (K/ μ L). Se tomó en cuenta el valor absoluto (1.30 – 2.90 K/ μ L) y no el valor correspondiente al diferencial de la fórmula leucocitaria (20.5 – 40.5%). En el **Gráfico 2** se indican las frecuencias de los resultados obtenidos en el contaje.

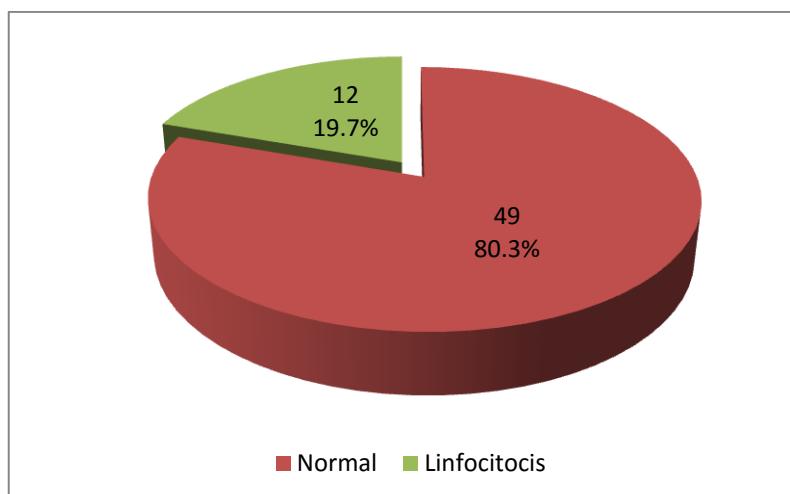


GRÁFICO 2. Frecuencias de los contajes normales y alterados de linfocitos en despachadores

Cuando se relaciona los resultados de los pacientes con linfocitosis con la variable tiempo de exposición al combustible se puede notar que existe un patrón de incremento directo entre ellos; a mayor tiempo de exposición, mayor contaje de linfocitos. Sin embargo, este patrón se pierde al pasar a la cuarta clase de los agrupamientos “tiempo de exposición”. Aunque esta situación puede deberse a que no se encontraron muchos pacientes que cumplan con los criterios del proyecto y que tengan un tiempo de exposición entre las clases en cuestión, se considera interesante que dos de los tres pacientes que tienen más de 18 años trabajando como despachadores, tengan linfocitosis. Ver **Tabla 6**.

TABLA 6.

Frecuencias de despachadores con linfocitosis por tiempo de exposición

TIEMPO DE EXPOSICIÓN (AÑOS)	PACIENTES AFECTADOS TOTAL = 12	LINFOCITOSIS
		K/ μ L >2.90* $\bar{X} \pm SD$
2.00 – 6.00	4 (33%)	3.27 \pm 0.49
6.08 – 10.00	3 (25%)	3.47 \pm 0.84
10.08 – 14.00	2 (17%)	3.87 \pm 0.33
14.08 – 18.00	1 (8%)	3.37 \pm 0.00
18.08 – 30.00	2 (17%)	3.56 \pm 0.01

*Se tomó en cuenta el valor absoluto del contaje de linfocitos.

En el conteo de monocitos, el 11.5% (7) de los trabajadores presentaron monocitopenia con una media de 0.26 ± 0.03 (K/ μ L), el 86,9% (53) mostró un conteo normal de monocitos con un promedio de 0.44 ± 0.12 (K/ μ L) y solo el 1,6% (1) monocitosis. Se tomó en cuenta el valor absoluto (0.30 – 0.80 K/ μ L) y no el diferencial de la fórmula leucocitaria (3.0 – 10.0%). Ninguna mujer se vio afectada en los resultados de este parámetro. El **Gráfico 3** revela las frecuencias de los resultados obtenidos en el conteo de monocitos.

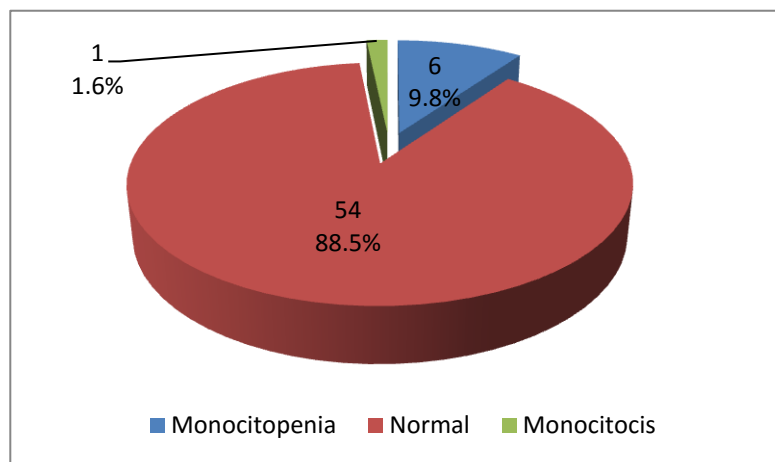


GRÁFICO 3. Frecuencias de los conteos normales y alterados de monocitos en despachadores

En el conteo de eosinófilos, ningún trabajador presentó eosinopenia. Mientras que, el 96,7% (59) tuvo un conteo normal de eosinófilos con un valor medio de 0.16 ± 0.09 (K/ μ L) y solamente el 3,3% (2) -un hombre y una mujer- presentaron casos de eosinofilia con un conteo promedio de 0.72 ± 0.25 (K/ μ L). Se tomó en cuenta el valor absoluto del conteo (0.02 – 0.54 K/ μ L) y no el diferencial de la fórmula leucocitaria (1.0 – 5.0%).

En el conteo de basófilos el 85,2% (52) de los trabajadores tuvieron un conteo normal con una media de 0.04 ± 0.02 (K/ μ L), pero el 14,8% (9) tuvo basofilia con un conteo celular promedio de 0.17 ± 0.05 (K/ μ L). Se tomó en cuenta el valor absoluto (0.00 – 0.10 K/ μ L) y no el diferencial de la fórmula leucocitaria (0.0 – 1.0%). Ninguna mujer se vio afectada en los resultados de este parámetro. El **Gráfico 4** presenta las frecuencias de los conteos en los despachadores.

Aunque no se observa ningún patrón al relacionar los resultados de los pacientes con basofilia con la variable tiempo de exposición al combustible, se puede observar que todos tienen contajes muy altos con valores de hasta el doble o casi el triple al límite superior del valor de referencia. Además, es interesante notar el resultado más alto del contaje de basófilos (0.27 K/ μ L), corresponde al paciente con mayor tiempo de exposición (30 años) de todo el grupo de pacientes estudiados en este proyecto. **Ver Tabla 7.**

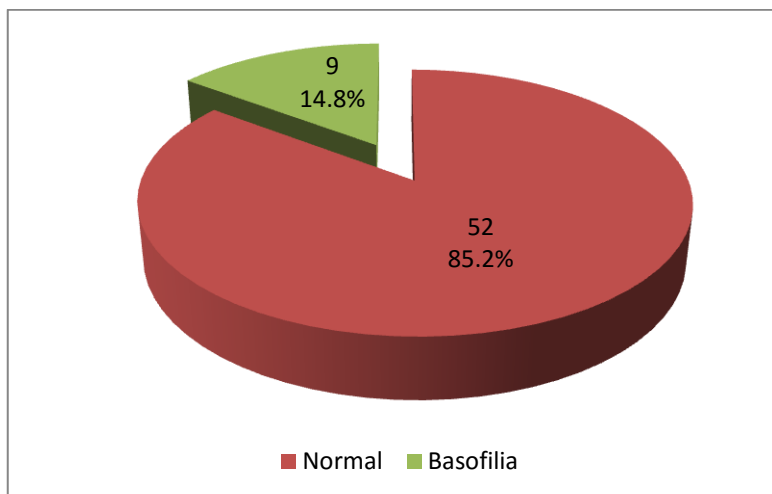


GRÁFICO 4. Frecuencias de los contajes normales y alterados de basófilos en despachadores

TABLA 7.

Frecuencias de despachadores con basofilia por tiempo de exposición

TIEMPO DE EXPOSICIÓN (AÑOS)	PACIENTES AFECTADOS TOTAL = 9	BASOFILIA
		K/ μ L >0.10*
		$\bar{X} \pm SD$
2.00 – 6.00	3 (33.5%)	0.14 \pm 0.03
6.08 – 10.00	1 (11%)	0.14 \pm 0.00
10.08 – 14.00	1 (11%)	0.20 \pm 0.00
14.08 – 18.00	3 (33.5%)	0.15 \pm 0.02
18.08 – 30.00	1 (11%)	0.27 \pm 0.00

*Se tomó en cuenta el valor absoluto del contaje de basófilos.

Respecto al contaje de plaquetas, el 100% (61) de los trabajadores presentaron resultados dentro del valor de referencia (150 – 450 K/ μ L) con un promedio de 257 ± 60 (K/ μ L) trombocitos. No existieron casos de plaquetopenia ni trombocitosis.

En el análisis de hematocrito ningún trabajador presentó niveles bajos. Mientras que, el 77% (47) de los trabajadores tuvieron valores dentro del rango de referencia, con un promedio de 49.3 ± 2.4 (%) para los hombres y 43.7 ± 1.8 (%) para las mujeres; el 23% (14) de los trabajadores presentaron valores altos con una media de 56.0 ± 1.5 (%). Solo una mujer tuvo resultados alterados en este parámetro. Ver **Tabla 8**.

TABLA 8.

Frecuencias de los hematocritos normales y alterados en despachadores

PARÁMETRO	# CASOS	# CASOS	TOTAL #	% TOTAL
RESULTADO	HOMBRES	MUJERES	TRABAJADORES	TRABAJADORES
Normal*	38	9	47	77.0
Alto	13	1	14	23.0

*VR Hombre 43.0 – 54.0 (%); Mujer 38.0 – 49.0 (%)

Nota: Los valores de referencia para el hematocrito recomendados por la OMS son de 40.0 – 50.0 (%) para hombres y de 35.0 – 45.0 (%) para mujeres, pero este valor fue corregido con +4 (%) en base a una tabla que la misma entidad ofrece para personas que viven entre los 2500 – 3000 metros sobre el nivel del mar como sucede en la ciudad de Quito donde se realizó el presente proyecto. (OMS, Indicadores, 2011)

Al relacionar la variable tiempo de exposición con los resultados de hematocrito elevado de los pacientes se puede apreciar que existe un patrón de tipo inverso entre estas; a mayor tiempo de exposición, mayor porcentaje de hematocrito. Sin embargo, se puede notar que en la cuarta clase del agrupamiento “tiempo de exposición” ya se pierde este patrón y no se presentó ningún caso que pertenezca a la quinta clase. Ver **Tabla 9**.

TABLA 9.

Frecuencias de despachadores con hematocrito elevado por tiempo de exposición

TIEMPO DE EXPOSICIÓN (AÑOS)	PACIENTES AFECTADOS TOTAL = 13	HCTO. ELEVADO % > 54.0* $\bar{X} \pm SD$
2.00 – 6.00	2 (15%)	56.4 ± 0.1
6.08 – 10.00	4 (31%)	56.5 ± 1.3
10.08 – 14.00	2 (15%)	56.8 ± 1.6
14.08 – 18.00	5 (39%)	55.3 ± 1.8
18.08 – 30.00	-	-

*En esta tabla no se tomó en cuenta a las mujeres por existir un solo caso aislado.

Finalmente, los resultados de la medición de la hemoglobina revelaron que ninguno de los trabajadores tuvo concentraciones por debajo del valor de referencia. Por otro lado, el 67,2% (41) de trabajadores tuvo una concentración de hemoglobina normal con una media de 16.5 ± 0.6 (g/dL) para los hombres y 14.4 ± 0.5 (g/dL) para las mujeres; entre tanto que, el 32,8% (20) de despachadores tuvieron concentraciones de hemoglobina por encima del rango de referencia con una media de 18.1 ± 0.7 (g/dL) y valores de hasta **19.3 g/dL**. Solo una mujer tuvo resultados alterados en este parámetro y corresponde a la misma que presentó hematocrito elevado. El **gráfico 5** indica las frecuencias y los resultados obtenidos en la determinación de hemoglobina.

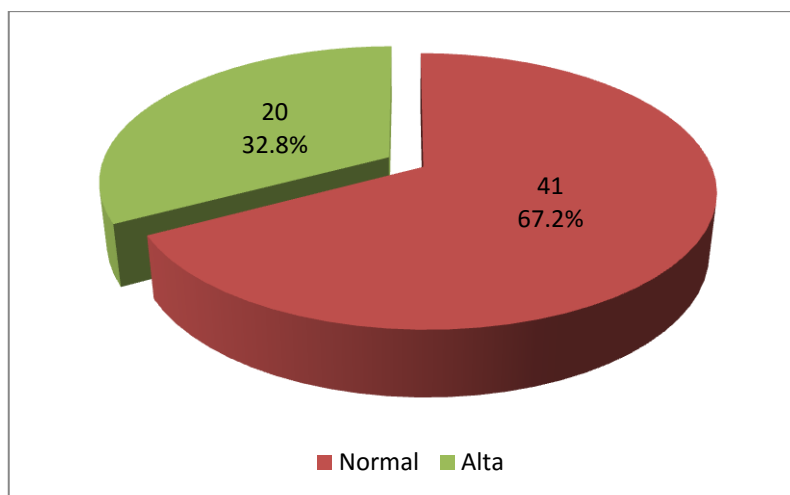


GRÁFICO 5. Frecuencias de concentraciones normales y alteradas de hemoglobina en despachadores. VR Hombre 13.6 – 17.4 (g/dL); Mujer 12.6 – 15.4 (%)

Nota: Los valores de referencia para hemoglobina recomendados por la OMS son de 13.0 – 16.0 (g/dL) para hombres y de 12.0 – 14.0 (g/dL) para mujeres, pero este valor fue corregido con +1.3 (g/dL) en base a una tabla que la misma entidad ofrece para personas que viven entre 2500 – 3000 metros sobre el nivel del mar como es en la ciudad de Quito (2850 m.s.n.m.) donde se realizó el presente proyecto. (OMS, Indicadores, 2011)

Cuando se relaciona los valores elevados de hemoglobina con el tiempo de exposición al combustible se puede notar que no existe ningún patrón entre ellos, en contraste con la medición del hematocrito. Sin embargo, aunque los rangos de referencia fueron corregidos, se puede ver que los despachadores siguen manteniendo una hemoglobinemia considerable muy por encima del valor de referencia ya modificado. Ver **Tabla 10**.

TABLA 10.*Frecuencias de despachadores con hemoglobina elevada por tiempo de exposición*

TIEMPO DE EXPOSICIÓN (AÑOS)	PACIENTES AFECTADOS TOTAL = 19	HB. ELEVADA
		g/dL > 17.4* $\bar{X} \pm SD$
2.00 – 6.00	5 (26%)	18.0 ± 0.6
6.08 – 10.00	5 (26%)	18.1 ± 0.7
10.08 – 14.00	2 (11%)	19.3 ± 0.0
14.08 – 18.00	5 (26%)	18.0 ± 0.8
18.08 – 30.00	2 (11%)	17.7 ± 0.5

*En esta tabla no se tomó en cuenta a las mujeres por existir un solo caso aislado.

4.1.1.2 MORFOLOGÍA DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS

ESTUDIO DEL FROTIS SANGUÍNEO

a) Hipersegmentación y bilobulación en neutrófilos

En el estudio se tomó en cuenta como alteración cuando en el extendido sanguíneo se encontró desde 5% de hipersegmentados (HS) en adelante. Los resultados mostraron que el 39.3% (24) de trabajadores tuvieron un promedio de 7 ± 2 (%) de HS sobre 100 neutrófilos contabilizados y se encontraron células que contenían entre 5 a 7 lóbulos. No obstante, hubo pacientes que presentaron hasta 12% de HS. Adicionalmente se encontró neutrófilos bilobulados en el 9.8% (8) de trabajadores, con un promedio de 2 a 3 células por paciente. En la **Tabla 11** se encuentran resumidos estos resultados.

TABLA 11.*Frecuencias de hipersegmentación y bilobulación en neutrófilos de despachadores*

ANOMALÍA	# CASOS HOMBRES	# CASOS MUJERES	RESULTADO	TOTAL DE CASOS	
				#	%
Hipersegmentación	21 (34.4%)	3 (4.9%)	$\geq 5\%$ hipersegmentados ≥ 5 lóbulaciones	24	39.3
Bilobulación	7 (11.5%)	1 (1.6%)	$\geq 2\%$ bilobulados	8	13.1

b) Granulación tóxica y punteado basófilo

En el estudio microscópico del extendido sanguíneo no se observó granulación tóxica ni punteado basófilo en ninguno de los despachadores de gasolina. Sin embargo, se pudo encontrar que algunos pacientes tenían un promedio de 10 ± 3 (%) de linfocitos -con granulación citoplasmática gruesa- sobre 100 linfocitos contabilizados. Esto corresponde al 47.5% (29) de todos los pacientes estudiados.

Es conocido que los linfocitos Natural Killer contienen gránulos citoplasmáticos citotóxicos y que se pueden encontrar normalmente en un porcentaje de 3 – 5 (%) en sangre periférica de cualquier paciente sin patología alguna, ya que son importantes en la respuesta celular innata. No obstante, cuando existen células tumorales, infectadas con virus, bacterias o parásitos intracelulares y en procesos inflamatorios crónicos su población aumenta considerablemente para eliminar las células dañadas. Situaciones que pudieran estar presentes en los pacientes de este estudio. Sin embargo, para confirmar el linaje celular y su porcentaje se necesita realizar inmunotipificación. (Rojas & Bolaños, 2008)

Las fotografías A, B y C mostradas en la **Figura 6** corresponden a las células descritas en esta sección y encontradas en el extendido de sangre periférica.

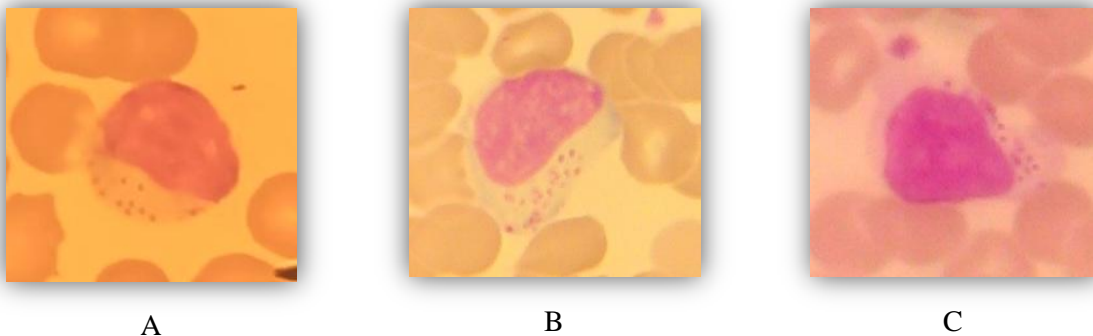


FIGURA 6 Granulación citoplasmática linfocitaria

Fuente: Chávez, Diego; Poveda, Adrián. Base de datos fotográficos de los autores

c) Células inmaduras

Durante el estudio del frotis sanguíneo se encontraron casos muy puntuales, cuyas frecuencias y tipos de anomalías se encuentran detalladas en la **Tabla 12**. Todos los casos son pertenecientes a pacientes hombres y de diferentes gasolineras.

TABLA 12.*Casos y tipos de células inmaduras encontradas en despachadores*

ANOMALÍA GENERAL	RESULTADOS		
	Anomalía encontrada		
	TIPO	# CASOS	%
Células inmaduras	Eritroblastos ortocromáticos	3	4.9
	Metamielocitos	4	6.6
	Mielocitos	1	1.6

d) Variaciones en la forma y tamaño del eritrocito

De acuerdo con el estudio de placa sanguínea, ningún paciente mostró eritrocitos con hipocromía o con tamaño disminuido como para tratarse de una microcitosis. Estos resultados concuerdan con los del análisis de MCH, MCHC y VCM de la biometría hemática automatizada. Ver **Tabla 13**.

TABLA 13.*Casos y tipos de anomalías encontradas en los eritrocitos en el estudio de placa*

ANOMALÍA GENERAL	RESULTADOS		
	ANOMALÍA ENCONTRADA		
	TIPOS	# CASOS	%
Poiquilocitosis	Dacriocitosis leve	10	16.4
	Equinocitosis leve	5	8.2
	Dacriocitosis y equinocitosis leve	2	3.3
	Dacriocitos y equinocitos ocasionales	29	47.5
	Estomatocitos	1	1.6
	Eliptocitos	1	1.6
	Ovalocitos	2	3.3
Anisocitosis y cromacia	Macroцитos hiperocrómicos	6	9.8
	Macroцитos normocrómicos	1	1.6
	Normocitos hiperocrómicos	23	37.7

4.1.2 ALTERACIONES INMUNOLÓGICAS

a) Cuantificación de IgG

El 23.0% (14) de pacientes tuvieron resultados por encima del valor de referencia para la IgG sérica total, o muy cerca del límite superior. De los pacientes afectados, el 8.2% (5) tuvo valores sobre el de referencia para IgG, con una media de 17.6 ± 1.0 (g/L). Mientras que, 14.8% (9) de pacientes estuvieron muy cerca del límite superior con una media de 15.7 ± 0.2 (g/L). En la **Tabla 14** se detallan estos resultados.

TABLA 14.

Frecuencias de alteraciones encontradas en la cuantificación de IgG

VARIABLE	UNIDAD	VALOR DE REFERENCIA	PARÁMETRO RESULTADO	# CASOS HOMBRES	% HOMBRES	# CASOS MUJERES	% MUJERES	# TOTAL AFECTADOS	% TOTAL AFECTADOS
IgG	g/L	7 - 16	Disminuido	0	0.0	0	0.0	0	0.0
			Normal	40	78.4	7	70.0	46	77.0
			En límite superior	8	15.7	1	10.0	9	14.8
			Aumentada	3	5.9	2	20.0	5	8.2
TOTAL DE PACIENTES AFECTADOS				11		3		14	

Al relacionar los valores de IgG sérica al límite del valor de referencia y sobre este, con el tiempo de exposición, se puede notar que existe de cierto modo un patrón inverso entre ellas; a mayor tiempo de exposición, las concentraciones de IgG empiezan a disminuir y empiezan a normalizándose. Pero se observa también que dentro de los primeros años –la primera clase de agrupación “tiempo de exposición”- es cuando existe el aumento considerable de esta inmunoglobulina en suero, comparada con las otras clases de la agrupación “tiempo de exposición”. Ver **Tabla 15**.

TABLA 15.*Frecuencias de despachadores con valores alterados de IgG por tiempo de exposición*

TIEMPO DE EXPOSICIÓN (AÑOS)	PACIENTES AFECTADOS TOTAL = 14	IgG
		g/L > 15.5* $\bar{X} \pm SD$
2.00 – 6.00	6 (43%)	17.2 ± 1.3
6.08 – 10.00	5 (36%)	15.8 ± 0.3
10.08 – 14.00	-	-
14.08 – 18.00	3 (21%)	15.6 ± 0.1
18.08 – 30.00	-	-

* Representa el valor que se tomó como cercano al límite superior del rango de referencia.

b) Cuantificación de IgA

El 29.5% (18) de trabajadores tuvieron resultados por encima del valor de referencia para la IgA sérica, o cercanos al límite superior. De los pacientes afectados, el 9.8% (6) tuvo valores sobre el de referencia para IgA con una media de 5.22 ± 1.36 (g/L), mientras que el 19.7% (12) de pacientes presentaron valores muy cerca del límite superior del rango de referencia con un promedio de 3.68 ± 0.17 (g/L). Los resultados se exponen en la **Tabla 16**

TABLA 16.*Frecuencias de alteraciones encontradas en la cuantificación de IgA*

VARIABLE	UNIDAD	VALOR DE REFERENCIA	PARÁMETRO RESULTADO	# CASOS HOMBRES	% HOMBRES	# CASOS MUJERES	% MUJERES	# TOTAL AFECTADOS	% TOTAL AFECTADOS
IgA	g/L	0.7 - 4.0	Disminuido	0	0.0	0	0.0	0	0.0
			Normal	35	68.6	8	80.0	43	70.5
			En límite superior	11	21.6	1	10.0	12	19.7
			Aumentada	5	9.8	1	10.0	6	9.8
TOTAL DE PACIENTES AFECTADOS				16		2		18	

Al relacionar los valores de IgA sérica al límite del valor de referencia y sobre este, con el tiempo de exposición, se puede notar que no existe un patrón específico entre ellas. Sin embargo, se puede ver que en los primeros seis años de exposición es cuando existe el aumento considerable de esta inmunoglobulina en suero, luego disminuye levemente, pero sigue manteniéndose elevada. Ver **Tabla 17**.

TABLA 17.

Frecuencias de despachadores con valores alterados de IgA por tiempo de exposición

TIEMPO DE EXPOSICIÓN (AÑOS)	PACIENTES AFECTADOS TOTAL = 18	IgA
		g/L > 3.50*
		$\bar{X} \pm SD$
2.00 – 6.00	4 (43%)	4.47 ± 1.17
6.08 – 10.00	4 (36%)	4.02 ± 0.54
10.08 – 14.00	2 (36%)	4.03 ± 0.55
14.08 – 18.00	7 (21%)	4.31 ± 1.45
18.08 – 30.00	1 (21%)	3.64 ± 0.00

* Representa el valor que se tomó como cercano al límite superior del rango de referencia.

c) Evaluación de la función fagocítica

Del total de despachadores de gasolina analizados (61) se obtuvo que el 59.0% (36) demostró un conteo de colonias al final del ensayo fagocítico por encima del número considerado como reducción bacteriana normal (≤ 35 UFC/mL 2h). En la sección de 120 minutos del agar sangre de los pacientes afectados se contabilizaron entre 38 y 184 UFC/mL con una media de 97 ± 48 (UFC/mL). La mitad 50% (5) de las mujeres que participaron en el estudio demostraron alteración en este patrón y del grupo de los hombres, el 61% (31). En el **Gráfico 6** se presentan las frecuencias que corresponden a cada grupo de pacientes.

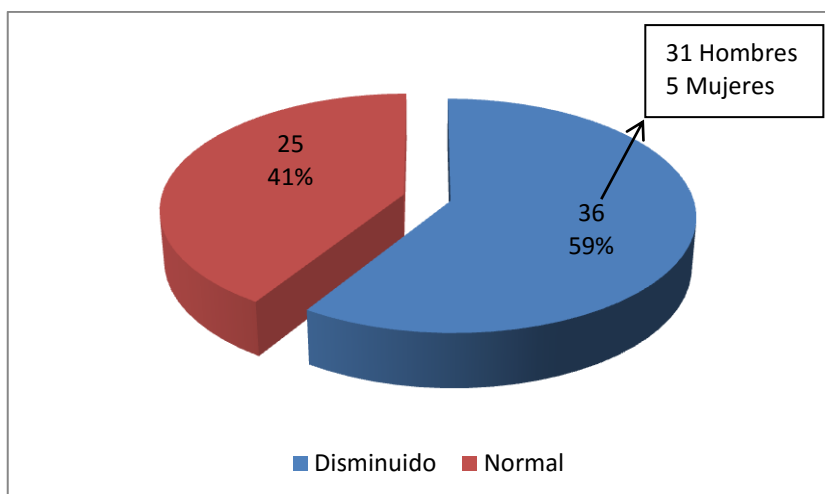


GRÁFICO 6. Frecuencias de alteraciones encontradas en el estudio de la función fagocítica

Con la finalidad de reconocer cuál o cuáles son las alteraciones más representativas en los trabajadores. Se agruparon los parámetros que presentaron alteraciones según el tiempo de exposición. Así, se puede notar que la alteración más representativa en los despachadores agrupados en cada clase es la presencia de algún tipo de “poiquilocitosis”, alcanzando el 100% (4 de 4) en los pacientes con el mayor tiempo de exposición.

A continuación, se encuentra la “fagocitosis disminuida” como alteración más común en todas las clases, seguida de la “neutropenia”, alteraciones en la “cromacia” de los glóbulos rojos y “anisocitosis” y la hipersegmentación. La **Tabla 18** presentan esta información de manera detallada.

Por otro lado, el alto de las barras de las alteraciones que se presentan agrupadas en cada una de las clases del **Gráfico 7** no deberán ser interpretadas en comparación con las mismas en otras clases, sino que en cada clase existe una cantidad de trabajadores que pertenece a ese tiempo de exposición y las barras representan la cantidad de despachadores con la alteración únicamente respecto a ese grupo. **Por ejemplo:** En una clase una barra de “x” anomalía puede estar muy elevada con 10 de 25 pacientes y en otra clase se observa la misma barra mucho más pequeña, pero en este grupo la anomalía se presenta en 4 de 4 pacientes, tornándose más significativa la “x” anomalía en este grupo.

TABLA 18.*Frecuencias de anomalías hematológicas e inmunológicas agrupadas según el tiempo de exposición de los trabajadores*

VARIABLE DE INTERÉS	TRABAJADORES QUE PRESENTAN ANOMALÍAS MÁS REPRESENTATIVAS									
	2.00 - 6.00 AÑOS DE TRABAJO		6.08 - 10.00 AÑOS DE TRABAJO		10.08 - 14.00 AÑOS DE TRABAJO		14.08 - 18.00 AÑOS DE TRABAJO		18.08 - 30.00 AÑOS DE TRABAJO	
	n = 25		n = 20		n = 4		n = 8		n = 4	
	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
Neutropenia	13	52	14	70	1	25	5	63	1	25
Linfocitosis	5	20	2	10	2	50	1	13	2	50
Basofilia	3	12	1	5	1	25	3	38	1	25
Hemoglobina elevada	5	20	6	30	2	50	4	50	3	75
Hematocrito elevado	2	8	5	25	2	50	4	50	1	25
Poiquilocitosis	20	80	16	80	3	75	5	63	4	100
Anisocitosis y cromacia	10	40	11	55	2	50	5	63	2	50
Hipersegmentación	10	40	7	35	0	0	6	75	1	25
Células inmaduras	3	12	2	10	0	0	2	25	0	0
IgG elevada	6	24	5	25	0	0	2	25	1	25
IgA elevada	4	16	4	20	2	50	6	75	2	50
Fagocitosis disminuida	14	56	14	70	3	75	3	38	2	50

Los porcentajes fueron calculados en base al "n" de cada grupo.

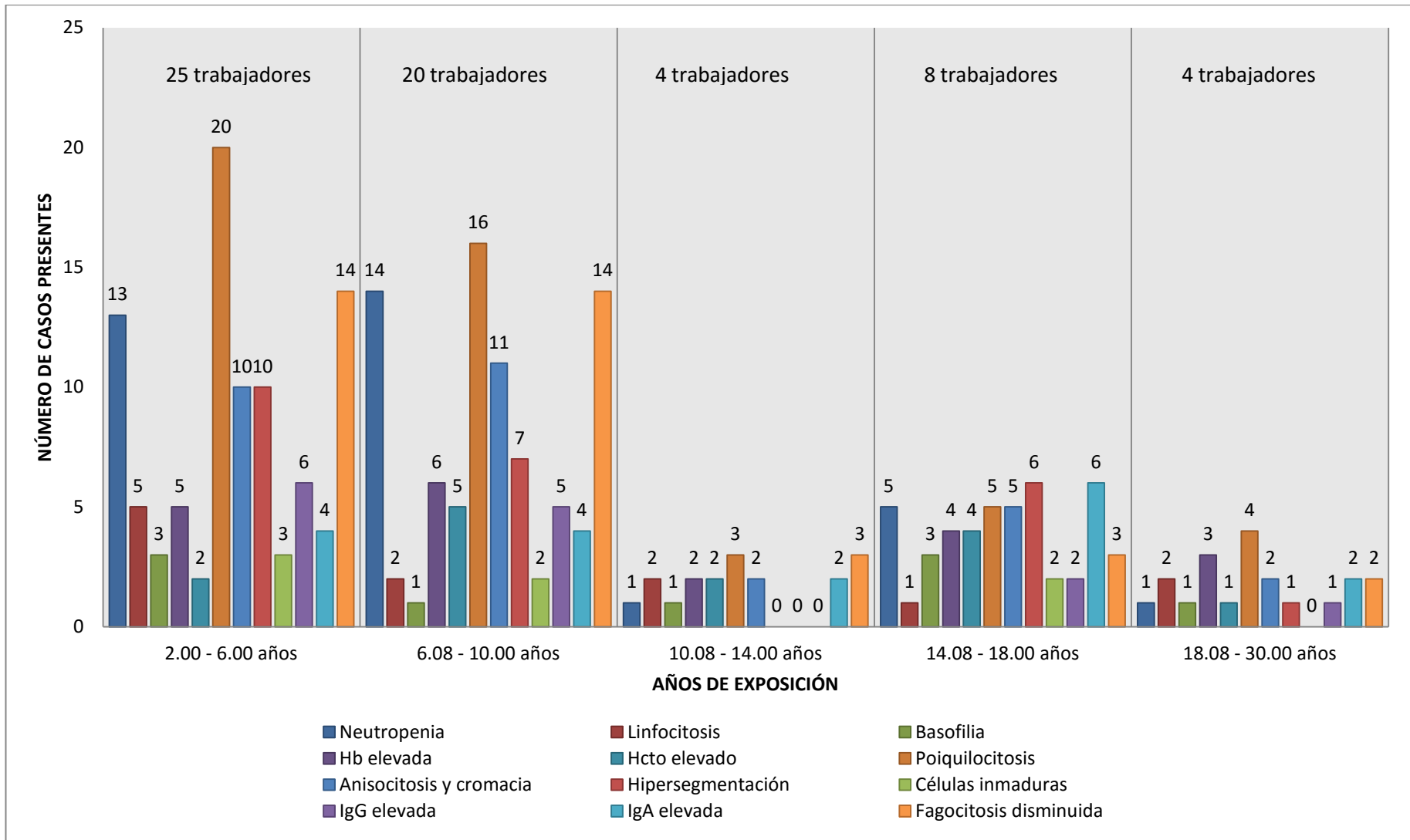


GRÁFICO 7. Agrupación de las frecuencias de anomalías hematológicas e inmunológicas en los trabajadores, según el tiempo de exposición

DISCUSIÓN

En el Ecuador existen más de 2500 despachadores de combustible en contacto directo con los surtideros de gasolina, los mismos que no han recibido una correcta capacitación para el cuidado de su salud y el manejo de combustibles durante sus largas jornadas de trabajo y por consiguiente han estado expuestos abiertamente por muchos años a los componentes tóxicos de la gasolina (hidrocarburos alifáticos, benceno y derivados, plomo, entre otros). Aunque el gobierno ha sumado esfuerzos para mejorar la calidad de los combustibles aún queda mucho por hacer en cuanto a las medidas de protección que deben ser implementadas para disminuir secuelas sobre la salud de estos trabajadores. En el presente estudio con la finalidad de describir cuáles son las alteraciones en el sistema hematológico e inmunológico, se analizaron 61 muestras de hombres y mujeres que laboran como despachadores de gasolina en 8 estaciones de servicio de combustible del Distrito Metropolitano de Quito, con un mínimo de dos años de exposición.

En relación a la situación socio-laboral de los despachadores de gasolina hemos notado que, efectivamente según la encuesta realizada, los trabajadores están sometidos a largos y continuos periodos de exposición con turnos de trabajo de 8, 12 y 24 horas consecutivas, algunos de ellos se han dedicado a esta actividad por hasta 30 años sin ningún equipo de protección personal que impida inhalar los vapores y/o evitar el contacto con el combustible. Adicionalmente, se evidenció que los empleadores de las diferentes estaciones de servicio sí proveen un kit de trabajo a cada despachador que incluye: gorra, mascarilla, guantes, overol, zapatos de punta de acero y arnés; pero los despachadores no están obligados a usar estos implementos durante su turno de trabajo, obviando los más importantes que son mascarillas y guantes. Conjuntamente, existe poco interés sobre los riesgos en la salud que supone la exposición continua a los componentes de la gasolina, ya que 19% de los empleadores creen que la salud de sus trabajadores no está en riesgo y 24% no quiso participar en el estudio; además solo conocen de los posibles efectos del plomo sobre la salud, ignorando los riesgos que podrían generar los demás componentes. En tal razón, no se ha podido controlar ni reducir el riesgo laboral en este sentido y los despachadores de gasolina siguen expuestos abiertamente a los efectos dañinos del combustible.

Con respecto al análisis del sistema hematológico, se pudo observar que un número considerable de trabajadores mantuvieron valores altos hemoglobina (32.8%) y de volumen corpuscular medio (VCM) (11.4%). Estos resultados se encuentran en concordancia con los del estudio de *Ordoñez* quién analizó los efectos hematológicos relacionados a la exposición a benceno y encontró 24% de personas afectadas con macrocitosis. Sin embargo, contrario a nuestro estudio en el cual encontramos que 23% de los trabajadores tenía hematocrito alto y 47.5% presentaron eritrocitos hiperocrómicos, la autora no reportó casos de hematocrito alto y evidenció hipocromía aunque solamente en un 6.7% de los trabajadores analizados. (Ordoñez, 2013). En otra investigación realizada en Brasil por *Rondó & Carvalho* que estudió la relación entre la concentración de hemoglobina y el plomo sanguíneo; se determinó que la relación entre ambas era inversamente proporcional, es decir, cuando existía mayor cantidad de plomo era menor la concentración de hemoglobina (Rondó, 2006); esto contrasta con nuestra investigación en la que se encontraron casos de hemoglobina y hematocrito elevados.

Otro hallazgo importante en el presente estudio es que varios trabajadores presentaron neutropenia (32.8%) y monocitopenia (11.5%), sin embargo, no existieron casos de linfopenia, eosinopenia, plaquetopenia, ni eritropenia. Nuestros resultados tienen concordancia parcial con el estudio realizado por *Lan & Zhang* “Hematotoxicidad en trabajadores expuestos a bajas concentraciones de benceno” en el que hubo una disminución en el conteo de toda la serie de glóbulos blancos y plaquetas pero no existió mayor disminución en el conteo de glóbulos rojos, demostrando que las bajas concentraciones de benceno -incluso de 1ppm- disminuyen los conteos de la serie de glóbulos blancos y plaquetas, comparados con el grupo control. (Lan & Zhang, 2006)

Nuestros datos sugieren que los eritrocitos de los pacientes estudiados no cumplen cabalmente la función de oxigenar las células del cuerpo, por esta razón aumentan de tamaño al igual que la concentración de hemoglobina, en un mecanismo que pretende compensar la pérdida de esta función que en parte se ve mermada por la acción asfixiante de los hidrocarburos alifáticos; pero que, mayoritariamente indica la modulación que ejerce el benceno sobre la médula ósea. (Peña, 2010)

Esta hipótesis se refuerza cuando existen 34.4% casos con poquilocitosis, 39.3% casos con neutrófilos hipersegmentados y además algunos casos en donde se encontraron células inmaduras: eritroblastos (3.3%); metamielocitos (6.6%); mielocitos (1.6%). ¿Podría ser que algunos pacientes estén en desarrollo de algún tipo de anemia megaloblástica o aplásica por acción del benceno?; una interconsulta con un hematólogo y varios estudios adicionales como el extendido de médula ósea, cuantificación de ácido fólico, vitamina B12, etc., serían importantes para poder llegar a un diagnóstico clínico conciso, ya que se conoce que el benceno es un componente carcinogénico que puede inducir a la aparición de anemias y leucemia en trabajadores expuestos durante largos períodos de tiempo aún en concentraciones mínimas ya que su metabolismo induce liberación de radicales libres de oxígeno afectando las células de la médula ósea en un mecanismo totalmente no esclarecido (Ling-Li & Guang-hui, 2015); (Snyder, 2012).

En sumatoria estos hallazgos sugieren que la mayor causa de intoxicación en la médula ósea y afectación hematopoyética se deben al benceno y no al plomo. Probablemente las concentraciones de plomo en el combustible que actualmente se expende en el país sean muy bajas pese a esto y debido a la escasa información generada por el ARCH aún no se puede asegurar que el combustible esté totalmente libre de plomo.

Respecto al análisis del sistema inmunológico, varios de los trabajadores presentaron linfocitosis (19.7%), basofilia (14.8%), y gránulos que se encontraron en el citoplasma de los linfocitos (47.5%); hallazgos característicos de inflamación crónica (Robbins, 2012). Esto tiene relación con el estudio realizado por *Carlsten & Blomberg* en el cual se comprobó que los vapores de diésel tienen un efecto en el aumento de productos de inflamación aguda tras una exposición corta de 2h, pero que puede volverse crónica si el tiempo de exposición es perpetuado; además estos vapores inducen a la activación de linfocitos Th2, la producción de IL-5 responsable de estimular el crecimiento de linfocitos B, aumentar la secreción de anticuerpos y atraer a eosinófilos (Carlsten & Blomberg, 2015); pese a que en nuestro estudio no se encontraron casos de eosinofilia pudimos observar un aumento en las inmunoglobulinas séricas, 29.5% y 23% de los trabajadores que presentaron niveles de IgA e IgG cercanos o por encima al límite superior de referencia respectivamente. A la vez estos interesantes descubrimientos concuerdan con un estudio realizado por *Mishra & Chauhan* en la India, que demostró que la exposición a

concentraciones bajas de plomo tienen efectos inmunoestimulantes aumentando los niveles séricos de: complemento C3, IgM, IgG e IgA, en contraste con la exposición a altas concentraciones que tienen efectos inmunosupresores (Mishra & Chauhan, 2006). Conjuntamente, *Navarra* recopila información de varios autores en un artículo que indica que en las personas expuestas a benceno existe una disminución de las citoquinas anti-inflamatorias y un aumento en las citoquinas pro-inflamatorias (Navarra, 2014).

Adicionalmente, existen otros hallazgos importantes, la neutropenia presente en el 32.8% de los casos y la función fagocítica disminuida en el 59.0% de los trabajadores, quienes tuvieron un contaje de colonias bacterianas por encima del número considerado como reducción bacteriana normal. Ambos mecanismos son imprescindibles en la defensa primaria del cuerpo frente a microorganismos, y al estar mermados en su capacidad vuelven al organismo más susceptible a infecciones bacterianas, fúngicas o mixtas (Robbins, 2012). No se ha determinado exactamente cuál es el porqué de la disminución en la capacidad fagocítica, puede deberse a la neutropenia y a la presencia de neutrófilos hipersegmentados, sin embargo, no se ha determinado la relación exacta entre la disminución de esta función a casos de intoxicación por benceno, no obstante, en el estudio realizado por *Klan & Adams* se notó una disminución significativa en la función fagocítica de los macrófagos expuestos a benceno *in vivo*, ya que generan cambios en los receptores que median la fagocitosis (Klan & Adams, 1990) . Esto revela que el benceno tiene efectos negativos sobre la fagocitosis, lastimosamente no hay estudios recientes que demuestren una relación entre el benceno y la función fagocítica.

En vista a los resultados que terminamos de enunciar y a que nuestro grupo de estudio está expuesto a largas jornadas de inhalación de hidrocarburos, benceno y plomo de la gasolina durante muchos años, es evidente que también existe afectación en el sistema inmunológico, por el estado de inflamación crónica en el que se encuentran los trabajadores y la disminución de la función fagocítica, sin embargo, no podemos asegurar cuál o cuáles son los componentes que causan mayor daño en este sistema.

CONCLUSIONES

Debido a que la gasolina es una mezcla de hidrocarburos con cientos de compuestos tóxicos para el ser humano y para el ambiente, en nuestro estudio no se puede saber a ciencia cierta cuál o cuáles de estos componentes son los que han causado o están causando mayor daño. Sin embargo, con el análisis de los resultados obtenidos en este proyecto hemos contribuido a entender de mejor manera el estado de salud en el que se encuentran actualmente las personas que trabajan como despachadores de gasolina en las diferentes estaciones de servicio de combustible participantes, ubicadas en la ciudad de Quito.

Respecto a la situación socio-laboral se conoce que los despachadores tienen jornadas de trabajo muy extensas y que empiezan con este tipo de trabajo desde jóvenes hasta llegar a la edad adulta. Además, reciben poca instrucción relacionada a la importancia de la seguridad industrial y protección individual que deben tomar en cuenta para disminuir el impacto dañino que ocasiona en su salud el exponerse de forma larga y constante a los componentes tóxicos de la gasolina. Este antecedente, sumado al hecho de que algunos empleadores no consideran importante, ni tampoco un problema para la salud de sus trabajadores este tipo de exposición, vuelve a este grupo poblacional más vulnerable a enfrentar problemas de salud.

En cuanto al sistema hematológico de los despachadores de gasolina se puede apreciar que sí existen alteraciones, tanto en la forma, tamaño y concentraciones celulares -exceptuando las plaquetas- respecto de los valores de referencia establecidos para cada parámetro medido. Asimismo, el sistema inmune de los trabajadores también presenta modificaciones al observarse una disminución de la actividad inmune innata y aumento de la adquirida. Estos resultados son lógicos debido a que ambos sistemas están íntimamente conectados y las variaciones en uno de ellos ocasionaría cambios de cualquier tipo en el otro y viceversa.

Este escenario se vuelve más interesante cuando se relacionan los cambios presentados en ambos sistemas investigados versus los tiempos de exposición de los despachadores, tomando en cuenta que estos trabajadores pertenecen a gasolineras de diferentes comercializadoras ubicadas en varias partes de la ciudad y lo que comparten entre ellos, es el tipo de trabajo y los largos y constantes periodos de exposición a los componentes del combustible sin ningún tipo de protección personal, por lo que, claramente se observa un patrón de cambio común en los sistemas hematológico e inmune de los despachadores de gasolina, a medida que el tiempo de libre exposición con estos tóxicos transcurre.

RECOMENDACIONES

Con el propósito de contribuir con el cuidado de la salud de este grupo poblacional se socializó los resultados encontrados en este proyecto con los despachadores de combustible y los empleadores de las diferentes gasolineras participantes. Además, se mantuvo una pequeña charla en la que se les explicó de manera puntual los hallazgos de este estudio y la importancia del uso de equipos de protección personal, en especial los guantes y mascarillas, para evitar el contacto directo y la inhalación de los vapores tóxicos del combustible. Los resultados fueron entregados en sobre cerrado a cada trabajador y se pidió a los empleadores que firmen un acta de recepción de los resultados, en dicho documento se dejó por escrito en resumen la información de la charla. (Ver **ANEXO 11**)

De la misma forma y a fin de que los resultados de este proyecto sean de mayor beneficio, serán compartidos con los Ministerios de Relaciones Laborales y de Salud del Ecuador, autoridades competentes para coordinar la generación de pautas y medidas sobre la salud ocupacional a favor de estos trabajadores, así como su supervisión en el cumplimiento de las normas de seguridad establecidas. También, se recomienda realizar estudios adicionales en los pacientes que presentaron anomalías para confirmar o descartar posibles enfermedades que pudieran haber permanecido ocultas y que constituyan una amenaza a futuro en la salud de estos empleados.

Finalmente, se considera imperioso realizar un estudio de tipo caso-control para establecer significancias de los resultados hallados en este proyecto y en el cual se pueda también ampliar la investigación respecto a las condiciones en que se encuentran otros sistemas u órganos de estos pacientes, tales como el respiratorio, nervioso central, riñón, hígado, etc.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A. K. (2012). *Inmunología celular y molecular*. Barcelona: Elsevier Saunders.
- ARCH. (2014). *Detailed Hydrocarbon Analysis Detail Report*. Quito - Manta - Sucumbíos: Summary Report.
- Atosuo, J., & Lilius, E. (Noviembre de 2011). The Real-Time based Assesment of microbial killing by the antimicrobial compounds of neutrophils. *The Scientific World Journal*, 2382 - 2390.
- Carlsten, C., & Blomberg, A. (2015). Diesel exhaust allergen-induced lower airway inflammation in allergic individuals: a controlled human exposure study. *Thorax BJM Publishing Group Limited*, 35-44.
- Cedrón, J., & Landa, V. (2011). *Corinto*. Obtenido de Pontificia Universidad Católica del Perú: <http://corinto.pucp.edu.pe/quimicageneral/contenido/368-soluciones-buffer-o-amortiguadoras.html>
- Centro de Formación San José de Calasanz. (2010). *Centro de Formación San José de Calasanz*. Recuperado el 3 de Mayo de 2015, de <https://raulcalasanz.wordpress.com/2012/09/10/ud1-fisiologia-leucocitaria-leucopoyesis-y-alteraciones-de-la-serie-blanca/>
- Decs. (2014). *Biblioteca Virtual en Salud*. Obtenido de Descriptores en Ciencias de la salud: <http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/>
- Espinoza, L., & Gómez, P. (2000). Ensayo alternativo para la medición de la activación de los neutrófilos. *BIOFARBO*, VI, 93-96.
- EUSAL. (2008). *Universidad de Salamanca*. Obtenido de Diccionario Médico-Biológico: <http://dicciomed.eusal.es/palabra/sintoma>
- Fernández, P. (01 de Diciembre de 2010). *Determinación del tamaño muestral*. Recuperado el 02 de Marzo de 2015, de Universidad de Epidemiología clínica y Bioestadística: <https://www.fisterra.com/mbe/investiga/9muestras/9muestras2.asp>
- González, J. (2010). *Técnicas y métodos de laboratorio clínico*. España: Elsevier Saunders.
- Henry, J. B. (2012). *Laboratorio en el Diagnostico Clínico*. Barcelona: Marbán.
- INEN. (2012). *ENMIENDA Gasolina Requisitos*. Quito: NTE INEN 935: 2012 Octava revisión.
- Klan, M., & Adams, D. (1990). Effects of exposure to benzene in vivo on the murine mononuclear phagocyte system. *Toxicol Appl Pharmacol Journal*, 198-205.

- Lan, Q., & Zhang, L. (03 de Diciembre de 2006). Hematotoxicity in Workers Exposed to Low Levels of Benzene. *Science*, 306(5702), 1774-1776.
- Ling-Li, Y., & Guang-hui, Z. (2015). Are Polymorphisms in metabolism protective or risk for reduced white blood cell counts in a Chinese population with low occupational benzene exposures? *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 232-240.
- Math, E., & Jelovcan, S. (2010). *El efecto de metales pesados en bajas concentraciones sobre el sistema inmune*. Austria: University of Graz.
- Matos, P. (2011). *UNMSM*. Obtenido de http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/tesis/ingenie/matos_sp/Concep.pdf
- Medmol. (22 de Enero de 2008). *Medicina Molecular*. Obtenido de FIBAO: <http://medmol.es/glosario/90/>
- Mishra, K., & Chauhan, U. (2006). *Efectos de la exposición al plomo en las inmunoglobulinas séricas y oxígeno reactivo*. Ghandi Institute of Medical Sciences, Departamento de inmunología, Lucknow.
- Molina, L., & Rondón, C. (2012). Anemias Sideroblasticas y punteado basófilo: Indicador biológico por exposición ocupacional al plomo y sus derivados. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, Caracas.
- Murray, P. R. (2009). *Microbiología Medica*. Barcelona: Elsevier Saunders.
- Navarra, P. M. (2014). Cytokine Network Involvement in Subjects Exposed to Benzene. *Journal Of Immunology Research*, 1-8.
- OMS. (2011). *Indicadores*. Recuperado el Junio de 2016, de Concentraciones de hemoglobina para diagnosticar la anemia y evaluar su gravedad: <http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin/es/>
- OMS. (Octubre de 2014). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs379/es/>
- Ordoñez, D. L. (2013). Identificación de alteraciones hematológicas por exposición a benceno, en los despachadores de dos estaciones de servicio de gasolina en quito, durante el período enero – mayo de 2013. *Repositorio Universidad Internacional SEK*.
- Peña, L. (2010). *Toxicología Clínica*. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas.
- Repetto, M. (2009). *Toxicología Fundamental*. Madrid: Diaz de Santos.
- Robbins. (2012). *Patología Humana*. Barcelona: Elsevier.

- Rodríguez, T., & Borrego, I. (2002). *Respuesta inmunológica en trabajadores expuestos a plomo*. La Habana: Red Cubana de Salud en el Trabajo.
- Rojas, F., & Bolaños, N. (2008). Valores de referencia de células asesinas naturales (NK y NKT) en donantes de sangre de Bogotá. *Acta médica colombiana*, 124-128.
- ROMERO, M. I. (2010). *Lab Care Colombia*. Obtenido de www.labcarecolombia.com/descargas_2.php?id=59
- Rondó, P. (2006). Lead, hemoglobin, zinc protoporphyrin and ferritin concentrations in children. *Rev Saúde Pública Brasil*, 71-76.
- SIGMA, A. (2002). *Product Information Histopaque 1.119*. St. Louis, MO / USA: Sigma Aldrich.
- Silos, J. M. (2008). *Manual de lucha contra la contaminación por hidrocarburos*. España: Universidad de Cádiz.
- Snyder, R. (2012). Leucemia y Benceno. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2875-2893.
- Sordelli, & FMED. (Enero de 2010). *Universidad de Buenos Aires*. Recuperado el Febrero de 2014, de Facultad de Medicina: <http://www.fmed.uba.ar/depto/microbiologia/gt2010.pdf>
- Williams, J., & Marshall, A. (2005). *Manual de Hematología* (Sexta edición ed.). Madrid: MARBÁN.

ANEXOS

ANEXO 1: GASOLINERAS DE QUITO SELECCIONADAS AL AZAR.

N°	CODIGO DE LA ESTACIÓN DE SERVICIO	ESTADO ACTUAL	DIRECCION	PARROQUIA
1	2010703	Activo	Av. América y Villalengua	Quito
2	2010722	Activo	Av. Simón Bolívar frente al colegio LUDOTECA	Quito
6	2010274	Activo	Av. América y Mañosca	Quito
7	2011162	Activo	Av. Eloy Alfaro y Granados	Quito
9	2010036	Cerrada	Madrid E14-28 y Lugo	Quito
14	2010467	Activo	J. Collahuazo 524 y Quitus	Quito
16	2010431	Activo	Autopista Gral. Rumiñahui Km.3.5	Quito
17	2010517	Activo	Av. Interoceánica y Eloy Alfaro	Tumbaco
25	2011261	Activo	Pio XII Y Mantilla, Lote 10	Calderón
27	2011306	Activo	Av. Mariscal Sucre No. S51-314	Quito
28	2010023	Activo	Av. G. Pérez 1236 y Av. Corazón	Calderón
29	2011323	Activo	Nueva Vía Oriental S/N,Lt.2	Quito
33	2011464	Activo	Av. Diego De Vásquez De Cepeda	Quito
34	2011531	Activo	Panamericana Km.32 a Yaruqui	Quito
36	2010034	Activo	Av. América y Riofrio (Esq.)	Quito
37	2010365	Activo	Av. Occidental y Dávalos Hernando	Quito
41	2010749	Activo	Av. Oriental	Quito
43	2010021	Activo	Av. Mariscal Sucre y Pilaló	Quito
45	2010685	Activo	Pedro Vicente Maldonado #668	Quito
46	2010750	Activo	Av. Eloy Alfaro y A. Basantes	Quito

Continúa en la siguiente página 78.

N°	CODIGO DE LA ESTACIÓN DE SERVICIO	ESTADO ACTUAL	DIRECCION	PARROQUIA
49	2010062	Activo	La Prensa y Mariano Echeverría	Quito
51	2010515	Activo	Av. G. Córdova Galarza y Vergel	Pomasqui
55	2011405	Activo	Av. Galo Plaza Laso y F. Dalmau	Quito
56	2010423	Activo	Av. Maldonado 11590-Pusir	Quito
59	2010065	Activo	B. De Caráquez 3015 y Paya	Quito
61	2010217	Activo	Tumbaco Vía Inter. Km.17	Tumbaco
63	2010255	Activo	Mariscal Sucre Y Juan Figueroa	Quito
64	2010634	Activo	Av. Diego De Vásquez -Ponciano	Quito
65	2010677	Activo	Av.5 De Junio 1438 -Enríquez	Quito
66	2010722	Activo	Conocoto Av. Ilaló Y Calle K	Conocoto
67	2010015	Activo	Av. Maldonado 10145 y Quimiag	Quito
69	2010047	Activo	10 De Agto.3754 y NN.UU.	Quito
70	2010049	Activo	Km.1 Av. Gral. Rumiñahui	Conocoto
71	2010051	Activo	Av. Maldonado 281 y Fco. Gómez	Quito
74	2010358	Activo	Km. 14 Interoceánica - El Dorado	Tumbaco
75	2010377	Activo	Av. 6 De Diciembre Y Pasaje A	Quito
80	2010746	Activo	Av. Eloy Alfaro Y Los Fresnos	Quito
81	2010800	Activo	Av. Eloy Alfaro Y Álamos	Quito
85	2010824	Activo	Av. Occidental Sector El Condado	Quito
92	2011413	Activo	Av. Eloy Alfaro 45100 Higuera	Quito
93	2011436	Activo	Manta Oe4-573 Diagonal Pintulac	Quito

ANEXO 2: CARTA DE PRESENTACIÓN



Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Escuela de Bioanálisis

E-MAIL: dga@puce.edu.ec
Av. 12 de Octubre 1076 y Roca
Apartado postal 17-01-2184
Fax: 593 - 2 - 299 16 56
Telf: 593 - 2 - 2991535
Quito - Ecuador

Quito, 18 de enero de 2016

Sr.
XXXXXX
XXXXXX
Presente

De mis consideraciones:

La Pontificia Universidad Católica del Ecuador, a través de su Escuela de Bioanálisis ha aprobado el plan de disertación denominado: ***“valoración del sistema inmune y hematológico en trabajadores expuestos a componentes de la gasolina en estaciones de servicio de combustible de la ciudad de Quito***, el mismo que se realizará durante el año 2.016.

Bajo esta premisa, solicitamos a Usted, la autorización respectiva para que los estudiantes: Adrián Israel Poveda Paredes, con cédula de identidad número 171760589-1 y Diego Patricio Chávez Díaz con cédula de identidad número 171951250-9, alumnos regulares de la Escuela de Bioanálisis, realicen una encuesta estructurada al personal que labora en su empresa como despachador de combustible y a su persona o a quien usted delegue para recopilar información estrictamente relacionada con el proyecto.

Es importante mencionar, que la información proporcionada por usted mantendrá la confidencialidad del caso y al finalizar el proyecto, los resultados generados serán compartidos con usted y los miembros de su empresa que participen en las encuestas.

Finalmente, a la espera de su aprobación, agradecemos de antemano su apoyo y apertura para la recolección de la información contenida en las encuestas.

Atentamente,

Máster Oscar Puente
Director de la disertación
Escuela de Bioanálisis

ANEXO 3: ENCUESTA AL EMPLEADOR

Exposición a componentes de la gasolina y posibles consecuencias en la salud.

Es importante resaltar que el objetivo del estudio es netamente investigativo. Además, aseguramos que la información recolectada y los resultados obtenidos serán confidenciales.

Nombre y Apellido: _____

Fecha: _____ **Tel.:** _____

Nombre de la empresa: _____

Dirección de la empresa: _____

RELACIONADAS AL TRABAJO

1. ¿Cuántos trabajadores tiene en esta estación de servicio?

Administrativos: _____ Despachadores de combustible: _____

2. ¿Cuántos días a la semana trabaja un despachador de gasolina?

3. ¿De cuántas horas son sus turnos de trabajo?

8 h 12 h 24 h Otras: Especifique _____

4. ¿Cómo son los turnos de sus trabajadores?

Fijos Rotativos

RESPECTO A LOS DESPACHADORES DE GASOLINA

5. ¿Cuál de estos equipo de protección personal provee a sus empleados?

Uniforme Guantes
 Mascarilla Botas

6. ¿Considera que las actividades que realizan sus trabajadores durante su turno, son de riesgo para su salud? Si No

7. ¿Le gustaría que hagamos exámenes de laboratorio gratuitamente a sus empleados, a fin de determinar cómo se encuentra su salud?

Si No

ANEXO 4: ENCUESTA AL TRABAJADOR

Exposición a componentes de la gasolina y posibles consecuencias en la salud.

Nombres y Apellidos: _____

Fecha: _____ **Tel.:** _____

Nombre de la empresa: _____

Dirección de la empresa: _____

Relacionadas a la persona

1. Sexo: Hombre Mujer
2. Edad: _____ años
3. Sector de su vivienda: _____
¿Considera que su hogar está expuesto a contaminación **ambiental** fuerte?
 No Si ¿Por qué? _____

Relacionadas al trabajo

4. ¿Cuánto tiempo trabaja en esta empresa? _____
5. ¿Cuántos días a la semana trabaja como despachador? _____
6. ¿De cuántas horas es su turno de trabajo?
 8 h 12 h 24 h Otras: Especifique _____
7. Realiza horas extras No Si
a. ¿Cuántas a la semana? _____
8. ¿Qué equipos de protección personal le proveen para su trabajo?
 Uniforme Guantes
 Mascarilla Botas
9. ¿Cuál de los equipos que le proveen usa constantemente?
 Todos Algunos: Especifique _____
10. ¿A qué se dedicaba antes de este empleo? _____
¿Cuánto tiempo? _____

11. Aparte de este empleo, ¿se dedica a otra actividad laboral?

Si No Especifique: _____

Relacionadas a la salud

12. ¿Usted fuma? No Si

13. ¿Cuándo fue la última vez que consumió bebidas alcohólicas?

_____ ¿Qué cantidad? _____

14. ¿Sufre de alguna enfermedad alérgica?

No Si ¿Cuál? _____

15. ¿Sufre de alguna enfermedad del hígado?

No Si ¿Cuál? _____

16. ¿Toma algún tipo de medicación continua?

No Si ¿Cuál(es)? _____

¿Por qué le recetaron? _____

¿Cuánto tiempo lleva tomándolas? _____

17. ¿Ha tenido una infección bacteriana o viral reciente?

Ejemplo: gripe, amigdalitis, hepatitis, dengue, diarrea, etc. No Si

¿Cuál? _____ ¿Cuándo? _____

18. ¿Ha recibido vacunas en los últimos 6 meses?

No Si ¿Cuál? _____

19. ¿Le gustaría realizarse exámenes de laboratorio gratuitos para saber cómo se encuentra su sistema inmunológico? Es decir, ¿cómo se defenderá su cuerpo ante posibles alergias, infecciones, gripes, etc.? No Si

20. Estaría dispuesto a firmar un consentimiento que nos autorice tomar un par de muestras de sangre suyas para los exámenes. No Si

ANEXO 5: CONSENTIMIENTO INFORMADO

DIRECTOR DISERTACIÓN: Máster Puente Valdivia Oscar Mauricio

NOMBRES: _____ **APELLIDOS:** _____

GASOLINERA/ESTACIÓN SERVICIO: _____

Objetivo del proyecto: La gasolina que se despacha a diario en todas las estaciones de combustible contiene una gran variedad de sustancias químicas que al exponerse de forma diaria puede provocar daños en la salud de manera silenciosa. Este proyecto de investigación quiere saber si existe alguna modificación en componentes del sistema de defensa del cuerpo (inmunidad) y/o de la sangre (hematológicos). Pedimos su ayuda voluntaria. Su participación ayudará a obtener información valiosa que ayudará a determinar mejores medidas de protección para usted y los futuros trabajadores de su área. El estudio incluirá unas 100 personas aproximadamente.

Participación voluntaria: Usted puede elegir libremente si desea participar o no en este proyecto de investigación. Si usted desea colaborar voluntariamente con nosotros, debe firmar (o poner su huella digital) en la línea situada abajo en este formulario, y llenar además una breve encuesta que será de ayuda para entender los resultados de los exámenes de laboratorio que se realizarán. No hay NINGÚN COSTO en ningún momento para participar en esta investigación, todo será totalmente gratuito para usted. Si tiene alguna duda, por favor pregunte al entrevistador o a las personas nombradas abajo.

Investigación: La información clínica y las muestras de sangre se utilizarán sin ninguna referencia a su nombre. Esta información será utilizada para estudiar las variaciones que pueden existir entre las personas que están expuestas a los componentes de la gasolina, comparadas con otras personas de sus mismas circunstancias pero que no han estado expuestas.

Confidencialidad: Toda la información que usted nos proporcione será mantenida confidencialmente y utilizada exclusivamente para propósitos de esta investigación, sin conexión a su nombre o el lugar donde trabaja. Los resultados generales serán compartidos con usted y el Ministerio de Salud Pública a manera de recomendaciones, al final del proyecto.

Riesgos: El único riesgo asociado a su participación, es la ligera molestia del pinchazo para la toma de muestra de sangre que serán 14 mL, que corresponden a unos dos cubitos de hielo. La toma de muestras será realizada por profesionales, debidamente entrenados, utilizando agujas y tubos para sangre estériles, únicos para cada paciente, siguiendo normas internacionales, lo que reducirá la posibilidad de molestias y complicaciones durante la toma de muestra.

Beneficios: Los beneficios potenciales de su participación son: la realización gratuita de exámenes de laboratorio específicos que no se realizan de rutina. El conocimiento sobre el estado de sus defensas (inmunidad) y saber si hay alguna modificación en los componentes de su sangre, datos con los que se puede tomar decisiones para mejorar su salud y al mismo tiempo tomar medidas que reduzcan el riesgo laboral para usted y los futuros trabajadores.

Compensación: No hay compensación financiera por participar en este proyecto.

Declaración general de consentimiento: “Al firmar abajo, declaro que los investigadores a cargo de este proyecto, me han explicado los propósitos, beneficios y riesgos de la investigación y que los he entendido plenamente. Entiendo claramente que no hay compensación monetaria por mi participación de parte de la PUCE, ni de las otras instituciones implicadas, y/o de sus empleados, ni tampoco yo debo cancelar valor alguno por mi participación, ya que he sido invitado a ser participante”. Al firmar abajo, declaro que entiendo el alcance y los objetivos del proyecto, y estoy dispuesto a participar voluntariamente.

Firma del Participante: _____ **Fecha:** _____ de _____ de 20__

Si tiene preguntas sobre esta investigación, por favor comuníquese con el Máster Oscar Puente, Universidad Católica del Ecuador. Ave. 12 de Octubre 1076 y Roca. Tel. (02)299 1700 ext. 1727. Fax. (02) 299 1726. Email: opuente740@puce.edu.ec.

ANEXO 6: INSERTOS PARA DETERMINACIÓN DE IgA e IgG.

NEPHSTAR® Immunoglobulin A (IgA) Kit

Catalog No. **DK001**

1. Intended Use

This product is used on NEPHSTAR® protein analysis system for quantitative determination of human **Immunoglobulin A (IgA)** in serum as an aid in diagnosis of abnormal IgA metabolism.

2. Summary

IgA accounts for 13% of the plasma immunoglobulins and serves to protect the skin and mucosa against microorganisms. It is capable of binding toxins, and develops in combination with lysozyme antibacterial and antiviral activity. IgA is the predominant immunoglobulin in bodily secretions such as colostrum, saliva and sweat. Secretory IgA provides defense against local infections and is important in binding food antigens in the gut.

Increased polyclonal IgA levels may occur in chronic liver diseases, chronic infections, autoimmune disorders (rheumatoid arthritis systemic lupus erythematosus), sarcoidosis and Wiscott-Aldrich syndrome. Monoclonal IgA increases in IgA myeloma. Decreased synthesis of IgA is observed in congenital and acquired immunodeficiency diseases such as Bruton type agammaglobulinemia. Reduced levels of IgA can be caused by protein-losing gastroenteropathies and loss through skin from burns.

3. Test Principle

Immunonephelometry is applied. This method involves measuring the light scattered by insoluble complexes formed by reaction between specific protein in samples and its respective antiserum, and the amount of scattered light is directly proportional to the concentration of the protein under condition that antiserum is in excess. Concentrations are automatically calculated by reference to a calibration curve stored in the instrument.

4. Kit Components

Code	Name	Volume/Quantity
DA001	IgA Antiserum	1×2.0 ml
DB001	IgA Reaction buffer	1×25.0 mL
DC001	IgA Magnetic card	1
DM001	IgA Control	1×0.3mL
	Manual	1

5. Materials required but not supplied

- 5.1 NEPHSTAR Protein analysis system (NS100)
- 5.2 NEPHSTAR Accessory pack (DK110)
- 5.3 Electronic pipette (YB201)
- 5.4 Pipette 5-50uL (YB301)
- 5.5 Pipette 100-1000uL(YB302)
- 5.6 Equipment for collection of Samples

6. Storage and Stability

The unopened reagent kit should be stored under 2-8°C and can be used until the expiry date labeled on the kit. Do not

freeze! The buffer should be equilibrated to room temperature before use. Once opened store the antisera and control at 2-8°C and the buffer at 18-25°C and be sure to screw on the cap tightly. Under these conditions the buffer is stable for 3 months, antisera and control for 1 month.

7. Sample Collection And Preparation

Use serum samples. Collect blood samples by venepuncture and let them clot naturally and separate the sera as soon as possible to prevent haemolysis. Sera may be stored at 2-8°C for 48 hours, otherwise freeze at -20°C or below; do not freeze and thaw sera more than once. Sample dilutions should be freshly prepared on the day of assay. Testing of the following types of sera may result in misleading values:

- 7.1 Highly lipemic, turbid and haemolysed samples are not suitable for nephelometric assays and should not be used unless centrifuged or prepared using other methods. If the background is too turbid and can not be removed, please think of other measuring method.
- 7.2 Testing of samples containing rheumatoid factors, paraproteins or circulating immunocomplexes can result in misleading values due to non-specific scattering light possibly generated by these articles.

8. Test Procedure

Summary: Reagent volumes added to the cuvette

Reagent	Volume
Sample (1/11)	40uL
IgA Reaction Buffer	400uL
IgA Antiserum	40uL

- 8.1 Switch NEPHSTAR on.
- 8.2 Enter chemistry number. Enter chemistry number of IgA kit (IgA=01). If IgA assay has never been performed on the instrument before, please swipe card when "please swipe card" is displayed.
- 8.3 The assay name and lot of reagent are displayed. Check carefully, press ENTER if the lot number is identical to that printed on the card or kit label, otherwise swipe card to update the curve data stored in NEPHSTAR.
- 8.4 Dilute samples or controls using NEPHSTAR Sample Diluent supplied in NEPHSTAR Accessory pack (Cat. No: DK110). The default dilution scheme for IgA assay is 1/11 (e.g. 400uL sample diluent + 40uL sample).
- 8.5 Prepare one cuvette for each sample to be assayed. Place a stirring bar to the cuvette using the forceps supplied with NEPHSTAR, then add 40uL of diluted sample carefully to the bottom of the cuvette.
- 8.6 Enter sample ID. Press number keys to enter the sample ID; or press ENTER to accept the currently displayed sample ID.
- 8.7 Enter sample dilution: 11. Accept the default sample dilution by pressing ENTER, otherwise press number keys to alter the dilution scheme.
- 8.8 Place cuvette in chamber. Place the cuvette containing a stirring bar and 40uL of diluted sample in the chamber and press it down slightly until it reaches the bottom of the chamber. The cuvette will be detected automatically.
- 8.9 Add reagent. Add 400 uL IgA reaction buffer and 40 uL IgA antiserum simultaneously into the cuvette using the electronic pipette (Cat. No.: YB201) supplied with NEPHSTAR. NEPHSTAR will sense the addition of reagents. With movement of the stirring bar, the assay begins after blanking and result will be printed automatically at the end of the assay.

- 8.10 On completion of the assay remove the cuvette, press ENTER to perform the next assay. Sample ID will increase sequentially. For alteration of the ID press BACK twice and tip in the right number.
- 8.11 If NEPHSTAR indicates result is higher than measurement range, reassay the sample at a higher dilution of e.g. 1/55 (160µL sample diluent + 40µL 1/11 diluted sample). Accordingly the sample dilution should be altered to 1/55 (press BACK and then the number keys to alter the sample dilution) .
- 8.12 If NEPHSTAR indicates result is lower than measurement range, reassay the sample at a lower dilution of e.g. 1/5 (160µL sample diluent + 40µL sample) . Accordingly the sample dilution should be altered to 1/5 (press BACK and then the number keys to alter the sample dilution) .
- 8.13 On completion of all assays of the same chemistry press ESC and return to step 8.2. Enter new chemistry number and begin another assay.

9. Quality Control

In accord with good laboratory practice, users should run control with every batch of samples. Results of control should fall in the validity range labeled on the control vial.

10. Sensitivity and measuring range

The sensitivity limit is 0.25 g/L and the upper limit is 5.0 g/L when the default dilution scheme is applied. The sensitivity limit is 0.12g/L when samples are diluted at 1/5.

11. Antigen Excess

Sample concentration of less than 12.0 g/L will not result in antigen excess, when the results will be misleadingly low. On suspicion of antigen excess please reassay the sample at dilution of 1/121 (400uL sample diluent + 40uL 1/11 diluted sample).

12. Reference Range

12.1 According to CRM470 , normal range of IgA concentration of healthy adult is : 0.7-4.0g/L. We recommend local reference ranges are produced.

12.2 Diagnosis and treatment can not only depend on determination of IgA. The clinical symptoms and other laboratory findings of respective patients should be taken into consideration.

13. Precision

Two analyte concentrations are assayed within several days using this kit of the same lot on NEPHSTAR. 20 repeat assays are performed for each concentration. The average coefficient variations (CV) for each concentration are displayed in the following table:

IgA (g/L)	CV (%)
5.10	1.58
0.55	2.09

14. Correlation Study

A correlation study is performed on 20 clinical serum samples using this kit on NEPHSTAR and Behring IgA reagent on BNII. The linear regression equation and correlation equation got as showed below demonstrate a good correlation between the two methods:

$$Y=0.96X+0.25$$

(Y= NEPHSTAR® IgA , X=BNII IgA)
Correlation coefficient r=0.976

15. Caution And Warning

15.1 The reagents are only for in vitro diagnostic use.

15.2 The reagents can be used only by trained personnel and good laboratory practice (GLP) and the stated procedure should be abided strictly.

15.3 All sera have been tested to be HIV(1&2) antibody negative, HBsAg negative. However, the performed testing method can not assure the absolute absence of infectious agents in blood products, so please be sure to handle the blood products such as controls and antisera as potentially infectious sources.

15.4 All reagents of the kit contain sodium azide as preservative. Take caution when handling them. Ingest or contact of the reagents with skin or mucous membranes is forbidden. Wash with large amount of water and seek medical advice if contact does occur. In addition, explosive metal azides may be formed with lead or copper plumbings; when disposing the reagents be sure to flush with large amount of water to avoid buildup of azide.

15.5 All components of kit are NEPHSTAR® specific. Reagents of different lots are not interchangeable, otherwise the results can be misleading.

16. References

16.1 Bablok W et al. General Regression Procedure for Method Transformation. J Clin Chem Biochem 1988; 26:783-790

16.2 Deutsch E, Geyer G, Wenger R, Laboratoriumsmedizin. Normalbereich der Ergebnisse und Interpretation abnormer Befunde, 3rd ed. Basel/Munich: Karger 1992.



Goldsite Diagnostics Inc.

3rd Floor, Technology Building Annex
7th Industrial Road, Shekou
Shenzhen, P.R.China, 518067
Tel: 86 755 26890807
Fax: 86 755 26890799



Wellkang Ltd t/a Wellkang Tech Consulting

Suite B,29 Harley Street
LONDON W1G 9QR
England, United Kingdom



NEPHSTAR® Immunoglobulin G (IgG) Kit

Catalog No. **DK004**

1. Intended Use

This product is used on NEPHSTAR® protein analysis system for quantitative determination of human **Immunoglobulin G (IgG)** in serum as an aid in diagnosis of abnormal IgG metabolism.

2. Summary

IgG is a predominant serum immunoglobulin. Approximately 80% of serum immunoglobulin is IgG; its main task lies in defense against microorganisms, direct neutralisation of toxins and induction of complement fixation. IgG is the only immunoglobulin that can cross the placental barrier and provide passive immune protection for the foetus and newborn. This protection gradually catabolizes until the infant's own immunological system begins at about six months of age. Near adult levels are reached by 18 months.

Polyclonal IgG increases may be present in systemic lupus erythematosus, chronic liver diseases, infectious diseases, and cystic fibrosis. Monoclonal IgG increases in myeloma. Decreased synthesis of IgG is found in congenital and acquired immunodeficiency diseases and selective IgG subclass deficiencies. Decreased IgG concentrations are seen in protein-losing enteropathies, nephrotic syndrome and through the skin from burns.

3. Test Principle

Immunonephelometry is applied. This method involves measuring the light scattered by insoluble complexes formed by reaction between specific protein in samples and its respective antiserum, and the amount of scattered light is directly proportional to the concentration of the protein under condition that antiserum is in excess. Concentrations are automatically calculated by reference to a calibration curve stored in the instrument.

4. Kit Components

Code	Name	Volume/Quantity
DA004	IgG Antiserum	1×2.0 ml
DB004	IgG Reaction buffer	1×25.0 mL
DC004	IgG Magnetic card	1
DM004	IgG Control	1×0.3mL
	Manual	1

5. Materials required but not supplied

- 5.1 NEPHSTAR Protein analysis system (NS100)
- 5.2 NEPHSTAR Accessory pack (DK110)
- 5.3 Electronic pipette (YB201)
- 5.4 Pipette 5-50uL (YB301)
- 5.5 Pipette 100-1000uL(YB302)
- 5.6 Equipment for collection of Samples

6. Storage and Stability

The unopened reagent kit should be stored under 2-8°C and can be used until the expiry date labeled on the kit. Do not freeze! The buffer should be equilibrated to room temperature

before use. Once opened store the antisera and control at 2-8°C and the buffer at 18-25°C and be sure to screw on the cap tightly. Under these conditions the buffer is stable for 3 months, antisera and control for 1 month.

7. Sample Collection And Preparation

Use serum samples. Collect blood samples by venepuncture and let them clot naturally and separate the sera as soon as possible to prevent haemolysis. Sera may be stored at 2-8°C for 48 hours, otherwise freeze at -20°C or below; do not freeze and thaw sera more than once. Sample dilutions should be freshly prepared on the day of assay. Testing of the following types of sera may result in misleading values:

- 7.1 Highly lipemic, turbid and haemolysed samples are not suitable for nephelometric assays and should not be used unless centrifuged or prepared using other methods. If the background is too turbid and can not be removed, please think of other measuring method.
- 7.2 Testing of samples containing rheumatoid factors, paraproteins or circulating immunocomplexes can result in misleading values due to non-specific scattering light possibly generated by these articles.

8. Test Procedure

Summary: Reagent volumes added to the cuvette

Reagent	Volume
Sample (1/11)	15ul
IgG Reaction Buffer	400ul
IgG Antiserum	40ul

- 8.1 Switch NEPHSTAR on.
- 8.2 Enter chemistry number. Enter chemistry number of IgG kit (IgG=04). If IgG assay has never been performed on the instrument before, please swipe card when "please swipe card" is displayed.
- 8.3 The assay name and lot of reagent are displayed. Check carefully, press ENTER if the lot number is identical to that printed on the card or kit label, otherwise swipe card to update the curve data stored in NEPHSTAR.
- 8.4 Dilute samples or controls using NEPHSTAR Sample Diluent supplied in NEPHSTAR Accessory pack (Cat. No: DK110). The default dilution scheme for IgG assay is 1/11 (e.g. 400uL sample diluent + 40uL sample).
- 8.5 Prepare one cuvette for each sample to be assayed. Place a stirring bar to the cuvette using the forceps supplied with NEPHSTAR, then add 15uL of diluted sample carefully to the bottom of the cuvette.
- 8.6 Enter sample ID. Press number keys to enter the sample ID; or press ENTER to accept the currently displayed sample ID.
- 8.7 Enter sample dilution: 11. Accept the default sample dilution by pressing ENTER, otherwise press number keys to alter the dilution scheme.
- 8.8 Place cuvette in chamber. Place the cuvette containing a stirring bar and 15uL of diluted sample in the chamber and press it down slightly until it reaches the bottom of the chamber. The cuvette will be detected automatically.
- 8.9 Add reagent. Add 400 uL IgG reaction buffer and 40 uL IgG antiserum simultaneously into the cuvette using the electronic pipette (Cat. No.: YB201) supplied with NEPHSTAR. NEPHSTAR will sense the addition of reagents. With movement of the stirring bar, the assay begins after blanking and result will be printed automatically at the end of the assay.

Version: SM004E0707

8.10 On completion of the assay remove the cuvette, press ENTER to perform the next assay. Sample ID will increase sequentially. For alteration of the ID press BACK twice and tip in the right number.

8.11 If NEPHSTAR indicates result is higher than measurement range, reassay the sample at a higher dilution of e.g. 1/55 (160µL sample diluent + 40µL 1/11 diluted sample). Accordingly the sample dilution should be altered to 1/55 (press BACK and then the number keys to alter the sample dilution) .

8.12 If NEPHSTAR indicates result is lower than measurement range, reassay the sample at a lower dilution of e.g. 1/5 (160µL sample diluent + 40µL sample). Accordingly the sample dilution should be altered to 1/5 (press BACK and then the number keys to alter the sample dilution) .

8.13 On completion of all assays of the same chemistry press ESC and return to step 8.2. Enter new chemistry number and begin another assay.

9. Quality Control

In accord with good laboratory practice, users should run control with every batch of samples. Results of control should fall in the validity range labeled on the control vial.

10. Sensitivity and measuring range

The sensitivity limit is 2 g/L and the upper limit is 25 g/L when the default dilution scheme is applied. The sensitivity limit is 1.0 g/L when samples are diluted at 1/5.

11. Antigen Excess

Sample concentration of less than 60.0 g/L will not result in antigen excess, when the results will be misleadingly low. On suspicion of antigen excess please reassay the sample at dilution of 1/55 (160uL sample diluent + 40uL 1/11 diluted sample).

12. Reference Range

12.1 According to CRM470 , normal range of IgG concentration of healthy adult is : 7 - 16g/L. We recommend local reference ranges are produced.

12.2 Diagnosis and treatment can not only depend on determination of IgG. The clinical symptoms and other laboratory findings of respective patients should be taken into consideration.

13. Precision

Two analyte concentrations are assayed within several days using this kit of the same lot on NEPHSTAR. 20 repeat assays are performed for each concentration. The average coefficient variations (CV) for each concentration are displayed in the following table:

IgG(g/l)	CV (%)
18.32	1.98
4.56	2.09

14. Correlation Study

A correlation study is performed on 20 clinical serum samples using this kit on NEPHSTAR and Behring IgG reagent on BNI1. The linear regression equation and correlation equation got as showed below demonstrate a good correlation between the two methods:

$$Y=1.03X-0.156$$

(Y= NEPHSTAR® IgG , X=BNI1 IgG)
Correlation coefficient r=0.978

15. Caution And Warning

15.1 The reagents are only for in vitro diagnostic use.

15.2 The reagents can be used only by trained personnel and good laboratory practice (GLP) and the stated procedure should be abided strictly.

15.3 All sera have been tested to be HIV(1&2) antibody negative, HBsAg negative. However, the performed testing method can not assure the absolute absence of infectious agents in blood products, so please be sure to handle the blood products such as controls and antisera as potentially infectious sources.

15.4 All reagents of the kit contain sodium azide as preservative. Take caution when handling them. Ingest or contact of the reagents with skin or mucous membranes is forbidden. Wash with large amount of water and seek medical advice if contact does occur. In addition, explosive metal azides may be formed with lead or copper plumbings; when disposing the reagents be sure to flush with large amount of water to avoid buildup of azide.

15.5 All components of kit are NEPHSTAR® specific. Reagents of different lots are not interchangeable, otherwise the results can be misleading.

16. References

16.1 Bablok W et al. General Regression Procedure for Method Transformation. J Clin Chem Biochem 1988; 26:783-790

16.2 Deutsch E, Geyer G, Wenger R, Laboratoriumsmedizin. Normalbereich der Ergebnisse und Interpretation abnormer Befunde, 3rd ed. Basel/Munich: Karger 1992.



Goldsite Diagnostics Inc.

3rd Floor, Technology Building Annex
7th Industrial Road, Shekou
Shenzhen, P.R.China, 518067
Tel: 86 755 26890807
Fax: 86 755 26890799



Wellkang Ltd t/a Wellkang Tech Consulting

Suite B,29 Harley Street
LONDON W1G 9QR
England, United Kingdom



ANEXO 7: INSERTO PARA EL AISLAMIENTO DE PMN.

SIGMA-ALDRICH®

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA
Tel: (800) 521-8956 (314) 771-5765 Fax: (800) 325-5052 (314) 771-5757
email: techservice@sial.com sigma-aldrich.com

Product Information

Histopaque®-1119

Catalog Number **11191**

Storage Temperature 2–8 °C

Product Description

Histopaque®-1119 is a sterile, endotoxin tested solution of polysucrose and sodium diatrizoate, adjusted to a density of 1.119 g/mL. This ready-to-use medium, when used in conjunction with Histopaque-1077, facilitates the rapid recovery of viable mononuclear cells and granulocytes from small volumes of whole blood. Histopaque-1119 and Histopaque-1077 employ a one-step procedure developed on published observations.¹

Histopaque-1119 is a sterile solution of polysucrose, 60 g/L, and sodium diatrizoate, 167 g/L.
Density: 1.118–1.120 g/mL
Endotoxin: ≤0.3 EU/mL
pH: 8.8–9.0

Reagents and Equipment Required but Not Provided

- Histopaque-1077, Catalog No. 10771
- Centrifuge (swinging bucket rotor) capable of generating 700 × g
- Centrifuge tubes, 15 mL plastic, conical
- Isotonic phosphate buffered saline solution or appropriate cell culture medium

Precautions and Disclaimer

This product is for R&D use only, not for drug, household, or other uses. Please consult the Material Safety Data Sheet for information regarding hazards and safe handling practices.

Preparation Instructions

Specimen Collection - Collect blood in preservative-free anticoagulant (EDTA or heparin) or use defibrinated blood. For best results, blood should be processed within 2 hours.

Storage/Stability

Store the product at 2–8 °C protected from light. Histopaque-1119 has an expiration period of 3 years. Reagent label bears expiration date.

8. Resuspend the cells by gently drawing in and out of a Pasteur pipette.
10. Repeat steps 8 and 9 twice.
11. Resuspend cells in an appropriate volume of isotonic phosphate buffered saline solution or appropriate cell culture medium.

Procedure

A double gradient is formed by layering an equal volume of Histopaque-1077 over Histopaque-1119. Anticoagulated whole blood is carefully layered onto the upper Histopaque-1077 medium. During centrifugation, erythrocytes are aggregated by polysucrose and rapidly sediment. Granulocytes are found at the lower Histopaque-1077/1119 interface; whereas, lymphocytes and other mononuclear cells are found at the upper plasma/Histopaque-1077 interface. Erythrocyte contamination is negligible. Most extraneous platelets found in the upper interface are removed by low speed centrifugation during washing steps.

1. Add 3 mL of Histopaque-1119 to a 15 ml conical centrifuge tube.
2. Carefully layer 3 mL of Histopaque-1077 onto the Histopaque-1119 and bring to room temperature.
3. Carefully layer 6 mL of whole blood onto the upper gradient of the tube from step 2.
4. Centrifuge at 700 × g for 30 minutes at room temperature. Centrifugation at lower temperatures, such as 4 °C, may result in cell clumping and poor recovery.
5. Carefully remove centrifuge tubes. Two distinct opaque layers should be observed.
6. Aspirate and discard plasma to within 0.5 cm of the upper layer. Transfer cells from this layer to a tube marked "mononuclear".
7. Aspirate and discard remaining fluid to within 0.5 cm of the lower layer. Transfer cells from this layer to a tube labeled "granulocytes".
8. Wash the cells by addition of 10 mL of isotonic phosphate buffered saline to the tubes. Centrifuge 10 minutes at 200 × g. Remove the supernatant and discard.

9. Resuspend the cells by gently drawing in and out of a Pasteur pipette.
10. Repeat steps 8 and 9 twice.
11. Resuspend cells in an appropriate volume of isotonic phosphate buffered saline solution or appropriate cell culture medium.

At this point a variety of assays can be performed. The procedures are chosen according to individual discretion.

Erythrocytes should pellet to the bottom of the centrifuge tube. Granulocytes should band at the interface between Histopaque-1119 and Histopaque-1077. Mononuclear cells should band at the interface between Histopaque-1077 and the plasma. If observed results vary from expected results, please contact Sigma-Aldrich Technical Service for assistance.

References

1. English, D., and Andersen, B.R., Single-step separation of red blood cells, Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradient of ficoll-hypaque. J. Immunol. Methods, **5**, 249 (1974).

Histopaque is a registered trademark of Sigma-Aldrich® Biotechnology LP and Sigma-Aldrich Co.

1. Add 8 mL of Histopaque-119 to a 15 mL centrifuge tube.
2. Carefully layer 3 mL of Histopaque-1077 onto the Histopaque-119 and bring to room temperature.
3. Carefully layer 8 mL of whole blood onto the upper gradient of the tube from step 2.
4. Centrifuge at 700 x g for 30 minutes at room temperature. Centrifugation at lower temperatures such as 4 °C, may result in cell clumping and poor recovery.
5. Carefully remove centrifuge tubes. Two distinct opaque layers should be observed.
6. Aspirate and discard plasma to within 0.5 cm of the upper layer. Transfer cells from this layer to a tube marked "mononuclear".
7. Aspirate and discard remaining fluid to within 0.5 cm of the lower layer. Transfer cells from this layer to a tube labeled "granulocytes".
8. Wash the cells by addition of 10 mL of isotonic phosphate buffered saline to the tubes. Centrifuge 10 minutes at 200 x g. Remove the supernatant and discard.

MF,MAM 02/11-1
 Histopaque-119 is a sterile solution of polysucrose, 80 g/L, and sodium diatrizoate, 157 g/L. Density: 1.119-1.120 g/mL. Endotoxin $\leq 0.3\text{ EU/mL}$. pH: 8.8-9.0.
 Histopaque-1077 is a sterile, endotoxin tested solution of polysucrose and sodium diatrizoate, adjusted to a density of 1.119 g/mL. This ready-to-use medium, when used in conjunction with Histopaque-1077, facilitates the rapid recovery of viable mononuclear cells and granulocytes from small volumes of whole blood. Histopaque-119 and Histopaque-1077 employ a one-step procedure developed on published observations.

Resents and Equipment Required but Not Provided
 • Histopaque-1077, Catalog No. 10771
 • Centrifuge (swing bucket rotor) capable of generating 700 x g
 • Centrifuge tubes, 15 mL plastic, conical
 • Isotonic phosphate buffered saline solution or appropriate cell culture medium

Precautions and Disclaimer
 This product is for R&D use only; not for drug, household, or other uses. Please consult the Material Safety Data Sheet for information regarding hazards and safe handling practices.

Preparation Instructions
 Specimen Collection - Collect blood in preservative-free anticoagulant (EDTA or heparin) or use defibrinated blood. For best results, blood should be processed within 2 hours.

Storage/Stability
 Store the product at 2-8 °C protected from light. Histopaque-119 has an expiration period of 3 years. Reagent label bears expiration date.

Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc. Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see reverse side of the invoice or packing slip.

ANEXO 8: CONTROL DE CALIDAD DE BH EN EL EQUIPO ABX PENTRA 60

Inserto del control de calidad interno HORIBA Medical ABX Difftrol

LOT		PX 095					CONTROL										
		Rev 1					ABX Lysebio										
PARAMETRES PARAMETERS	UNITES UNITS	CONTROL					TOLERANCES TOLERANCE	CONTROL					TOLERANCES TOLERANCE				
		PENTRA						PENTRA									
		60 60C+ ES60	80 XL80	MS60	XLR	MSCRP		60 60C+ ES60	80 XL80	MS60	XLR	MSCRP					
GB WBC	10 ⁹ /mm ³ ; 10 ⁹ /l	2.4	2.5	2.5	2.5	2.6	± 0.4	7.4	7.4	7.6	7.4	7.7	± 1.0				
GR RBC	10 ⁶ /mm ³ ; 10 ¹² /l	2.44	2.38	2.40	2.38	2.41	± 0.16	4.54	4.54	4.52	4.54	4.54	± 0.20				
HB HGB	g/dl	6.9	7.0	6.9	7.0	7.0	± 0.4	13.4	13.4	13.4	13.4	13.5	± 0.5				
	g/l	69	70	69	70	70	± 4	134	134	134	134	135	± 5				
HT HCT	mmol/l	4.28	4.35	4.28	4.35	4.35	± 0.25	8.32	8.32	8.32	8.32	8.38	± 0.31				
	%	19.8	20.0	19.2	20.0	19.3	± 1.5	37.2	37.2	36.6	37.2	36.8	± 2.0				
VGM MCV	µm ³ fl	0.198	0.200	0.192	0.200	0.193	± 0.015	0.372	0.372	0.366	0.372	0.368	± 0.020				
TGMH MCH	pg	81	84	80	84	80.0	± 5	82	82	81	82	81.0	± 5				
CCMH MCHC	fmol	28.3	29.4	28.8	29.4	29.0	± 2.0	29.5	29.5	29.6	29.5	29.7	± 2.0				
	g/dl	1.76	1.83	1.79	1.83	1.80	± 0.12	1.83	1.83	1.84	1.83	1.85	± 0.12				
IDR RDW	g/l	34.9	35.0	35.9	35.0	36.3	± 3.0	36.0	36.0	36.6	36.0	36.7	± 3.0				
	mmol/l	349	350	359	350	363	± 30	360	360	366	360	367	± 30				
PLAQ. PLTS	10 ⁹ /mm ³ ; 10 ⁹ /l	21.68	21.74	22.32	21.74	22.55	± 1.86	22.35	22.35	22.73	22.35	22.80	± 1.86				
VPM MPV	µm ³ fl	13.0	13.0	12.8	13.0	10.8	± 4.0	12.8	13.2	12.5	13.2	11.0	± 4.0				
NEUT	%	75	70	73	70	74	± 20	246	245	247	245	240	± 30				
	#	9.5	9.7	9.5	9.7	9.0	± 2.0	9.5	9.7	9.7	9.7	9.1	± 2.0				
LYMPHO	%	1.32	1.38	1.38	1.38	1.45	± 0.35	4.14	4.19	4.33	4.19	4.45	± 0.90				
	#	55.0	55.0	55.3	55.0	55.6	± 10.0	56.0	56.6	57.0	56.6	57.8	± 10.0				
MONO	%	0.79	0.83	0.83	0.83	0.83	± 0.33	2.48	2.44	2.51	2.44	2.45	± 0.70				
	#	33.0	33.0	33.2	33.0	31.8	± 12.0	33.5	33.0	33.0	33.0	31.8	± 8.0				
EOS	%	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	± 0.08	0.22	0.22	0.23	0.22	0.23	± 0.22				
	#	3.5	3.3	3.0	3.3	3.0	± 3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	± 3.0				
BASO	%	0.13	0.14	0.14	0.14	0.16	± 0.13	0.30	0.30	0.30	0.30	0.31	± 0.30				
	#	5.3	5.5	5.5	5.5	6.2	± 5.3	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	± 4.0				
	%	0.08	0.08	0.08	0.08	0.09	± 0.08	0.26	0.25	0.23	0.25	0.26	± 0.23				
	%	3.2	3.2	3.0	3.2	3.4	± 3.0	3.5	3.4	3.0	3.4	3.4	± 3.0				

Reporte del control de calidad externo BIORAD

BIO-RAD	Lab 549528	Informe de resumen de muestra	Ciclo 10
	DISERLAB-PUCE AVENIDA 12 DE OCTUBRE 1076 Y CALLE ROCA QUITO PICHINCHA 593 ECUADOR	Programa de hematología	Mar 2015 – Feb 2016 N.º de muestra: 12 Fecha de muestra: 15 Feb 16 N.º lote: 260900

Instrumento: Horiba ABX Pentra 60/ES							
Analito	Unidad	Resultado	Media	Z-score	RMZ	Comparador	
1 Glóbulos Rojos	M/µL	5.34	5.39	-0.43	-0.25	Par	
1 Hematocrito	%	46.9	47.0	-0.10	0.41	Par	
1 Hemoglobina, Total	g/dL	17.6	17.3	0.98	0.91	Par	
1 Leucocitos	K/µL	16.9	15.6	1.61	0.67	Par	
1 MCH / VCM	pg/cell	31	32.0	-1.36	0.59	Par	
1 MCHC / CHCM	g/dL	36.5	36.7	-0.18	-0.37	Par	
1 MCV / VCM	fL	88	87.0	0.41	0.57	Par	
1 Plaquetas	K/µL	494	474	1.03	-0.05	Par	
1 RDW / ADE	%	13.2	12.1	1.69	3.31	Par	

Leyenda: ✓ Sin avisos ✖ Resultado ausente 1 Resultados tardíos ▽ 2.0 ≤ |Z-score| < 3.0 ✕ |Z-score| ≥ 3.0
 * Resultados modificados (por petición del laboratorio participante) ✖ Determinación no consistente de la media y DE

Consolidado de resultados de los controles internos corridos durante el mes de marzo hasta mayo del 2016 con el control HORIBA Medical ABX Difftrol, para el equipo ABX PENTRA 60

		<i>PORCENTAJE</i> Fórmula leucocitaria												
		<i>LEU</i>	<i>ERI</i>	<i>HGB</i>	<i>HCT</i>	<i>PLAQ</i>	<i>VCM</i>	<i>HCM</i>	<i>CHCM</i>	<i>NEU</i>	<i>LINF</i>	<i>MON</i>	<i>EO</i>	<i>BA</i>
CONTROL ALTO	LIMITE ALTO	21.6	5.29	16.7	46.9	530	93	34.4	39.3	78.3	21.5	12.1	12.8	8.7
	VALOR DIANA	19.4	5.04	16.1	44.4	480	89	31.9	36.3	68.3	13.5	7.0	6.0	4.4
	LIMITE BAJO	17.2	4.79	15.5	41.9	430	83	29.4	33.3	58.3	5.5	1.9	0.8	0.1
	MEDIA	19.6	5.03	16.2	45.5	447	90	32.3	35.6	69.6	13.9	6.5	6.1	3.9
	SD ±	0.98	0.08	0.15	0.95	11.72	0.57	0.34	0.51	0.4	0.35	0.25	0.26	0.15
	CV	4.98	1.65	0.93	2.1	2.62	0.63	1.06	1.42	0.57	2.53	3.93	4.24	3.79
CONTROL NORMAL	LIMITE ALTO	8.40	4.90	13.8	39.1	280	86.0	34.0	38.9	68.5	34.5	13.10	7.30	7.20
	VALOR DIANA	7.40	4.60	13.3	37.1	250	81.0	29.0	35.9	58.5	26.5	7.50	3.80	3.70
	LIMITE BAJO	6.40	4.40	12.8	35.1	220	76.0	27.0	32.9	48.5	18.5	1.90	0.30	0.20
	MEDIA	7.60	4.57	13.4	27.7	234	83.0	29.2	35.4	56.8	27.1	7.30	4.50	4.30
	SD ±	0.28	0.07	0.14	0.78	6.7	0.56	0.26	0.46	0.66	0.59	0.35	0.42	0.04
	CV	3.74	1.52	1.02	2.06	2.87	0.68	0.87	1.31	1.17	2.19	4.82	9.48	0.95
CONTROL BAJO	LIMITE ALTO	2.80	2.44	6.70	19.50	88	84.0	29.6	38	67.3	40.0	9.10	11.10	6.70
	VALOR DIANA	2.40	2.28	6.30	18.00	69	79.0	27.6	35	57.3	28.0	5.30	6.00	3.40
	LIMITE BAJO	2.00	2.12	5.90	16.50	48	74.0	25.6	32	47.3	16.0	1.50	0.90	0.10
	MEDIA	2.40	2.27	6.30	18.4	66	81.0	27.8	34.4	55.1	29.7	4.50	7.40	3.30
	SD ±	0.12	0.03	0.07	0.43	3.80	0.80	0.33	0.65	1.64	1.43	0.39	0.98	0.05
	CV	4.96	1.51	1.05	2.36	5.80	0.98	1.16	1.90	2.97	4.79	8.82	13.30	1.41

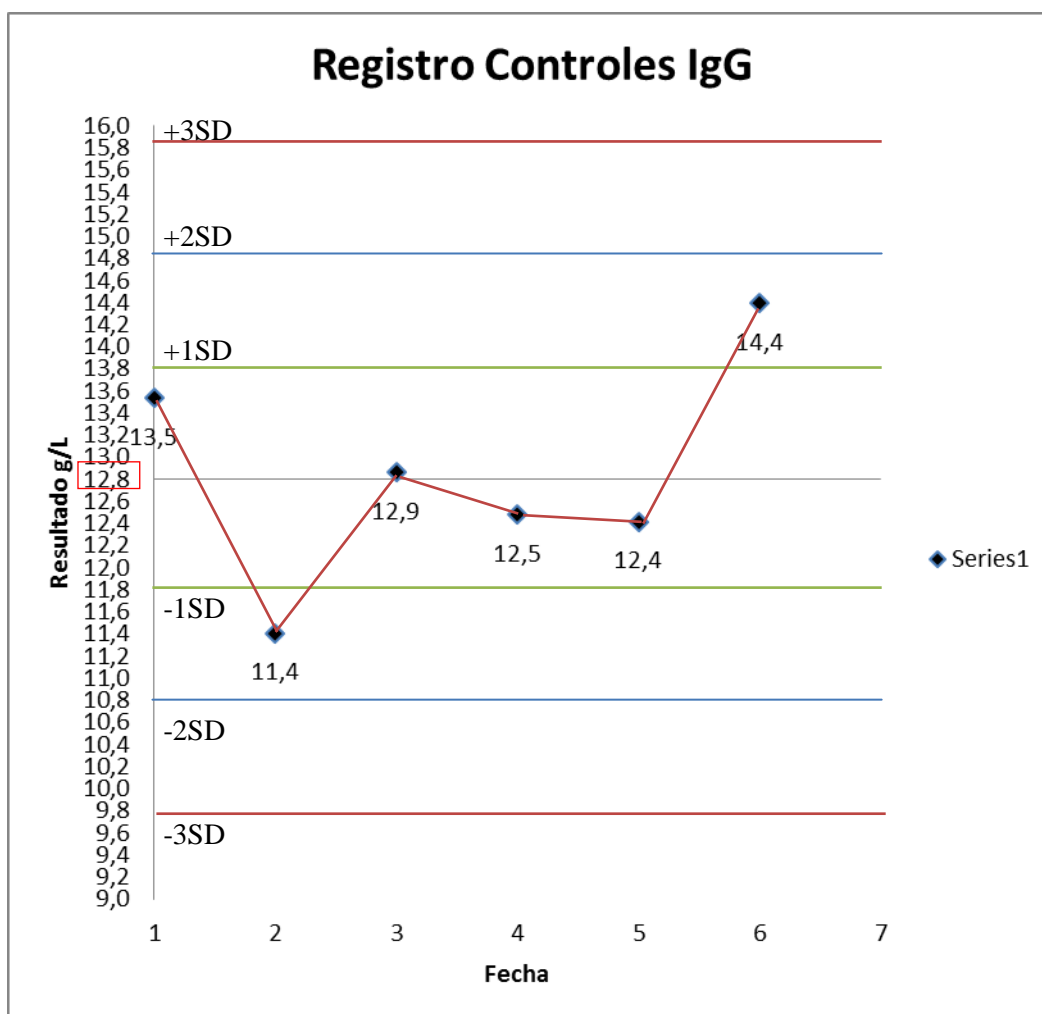
ANEXO 9: CONTROL DE CALIDAD PARA LA DETERMINACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS POR NEFELOMETRÍA.

Registro de controles de IgG

Cálculo de las desviaciones estándar

N°	Fecha	IgG Resultado g/L
1	4 marzo 2016	13.5
2	9 marzo 2016	11.4
3	30 marzo 2016	12.9
4	31 marzo 2016	12.5
5	13 abril 2016	12.4
6	14 abril 2016	14.4

3SD+	15.87
2SD+	14.85
SD+	13.82
\bar{X}	12.80
SD-	11.78
2SD-	10.75
3SD-	9.73

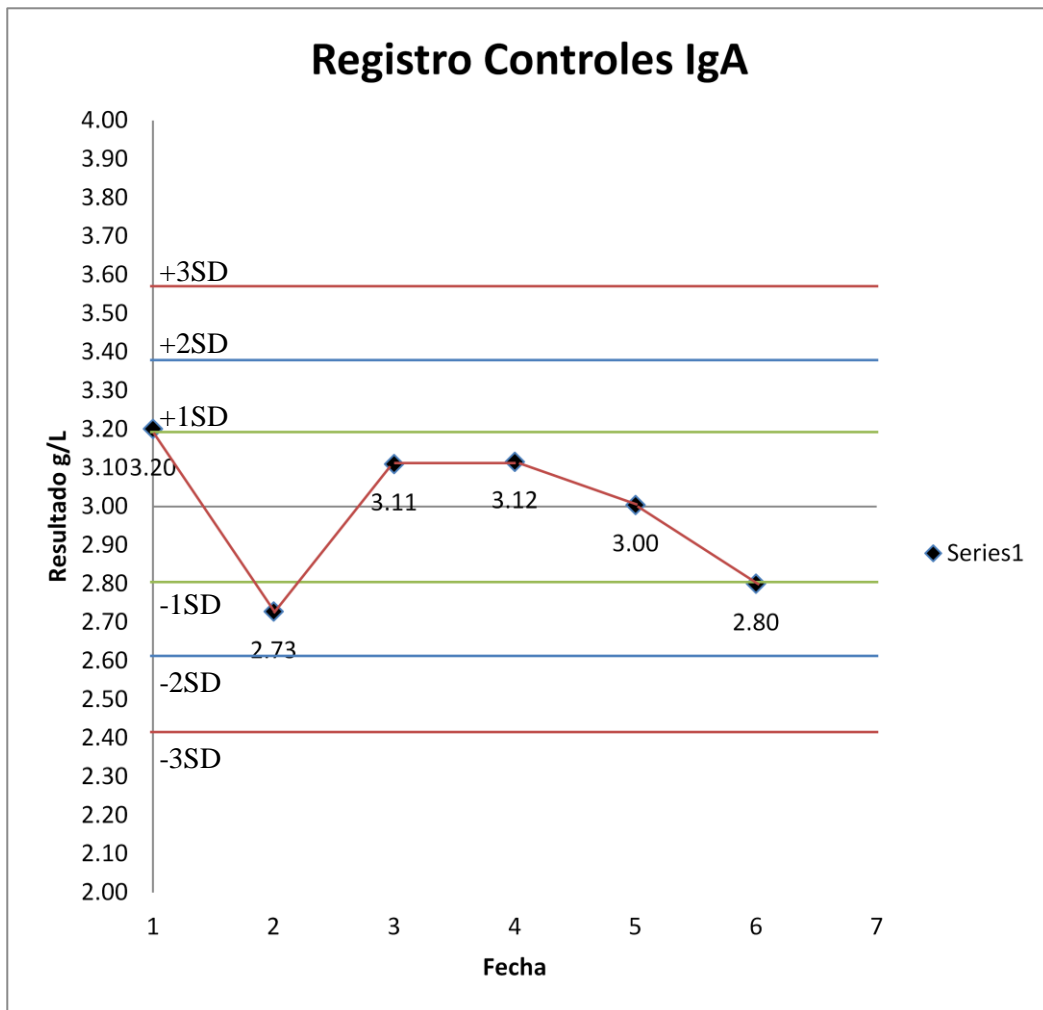


Registro de controles de IgA

Cálculo de las desviaciones estándar

N°	Fecha	Resultado g/L	\bar{X}	CV	SD
1	4 marzo 2016	3.20	2.99		
2	9 marzo 2016	2.73		0.17	
3	30 marzo 2016	3.11			0.19
4	31 marzo 2016	3.12			
5	13 abril 2016	3.00			
6	14 abril 2016	2.80			

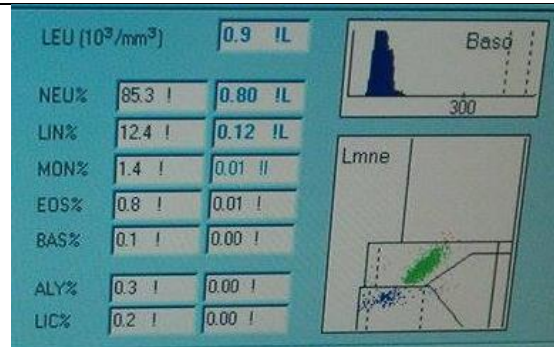
3SD+	3.57
2SD+	3.38
SD+	3.19
\bar{X}	3.00
SD-	2.81
2SD-	2.62
3SD-	2.43



ANEXO 10: CONTROL CALIDAD DEL ENSAYO FAGOCÍTICO.

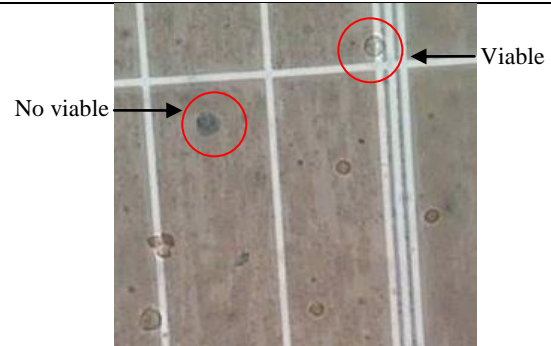
Determinación de la pureza del aislado mediante el análisis en el equipo automatizado ABX PENTRA 60.

- Se puede observar que el conteo de PMN equivale al 86.2% del total de leucocitos y los neutrófilos son el 85.3%. Esto indica un buen porcentaje de aislamiento de los PMN.

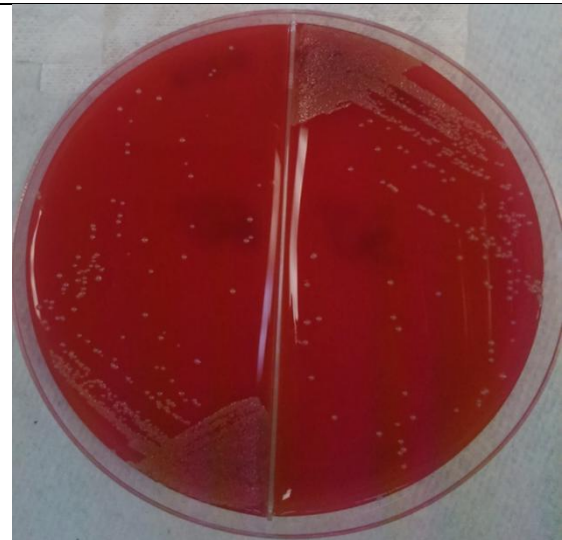


Determinación de la viabilidad celular mediante el uso del colorante azul tripan 0.4% (1:10) en la cámara de Neubauer.

- Se puede observar que la célula coloreada de azul no es viable mientras que las otras refringentes son células viables.



30 minutos / 60 minutos



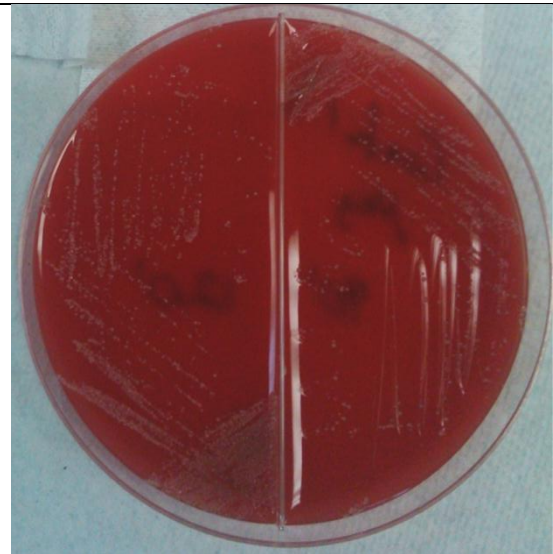
90 minutos / 120 minutos

CONTROL POSITIVO (Paciente sano)

Se puede observar que el número de colonias va disminuyendo según pasa el tiempo hasta que el conteo final en el área de conteo de la sección de 120 minutos es de 27 UFC/mL.



30 minutos / 60 minutos



90 minutos / 120 minutos

CONTROL NEGATIVO (Agua destilada estéril)

Se puede observar que el número de colonias no sufre ningún cambio según pasa el tiempo hasta que el conteo final en el área de conteo de la sección de 120 minutos sigue siendo >1000 UFC/mL.

REGISTRO DE CONTROLES

Registro de controles y resultados para el ensayo fagocítico.

ENSAYO FAGOCÍTICO											
N°	FECHA	VIABILIDAD CELULAR	CONTROL POSITIVO				CONTROL NEGATIVO				
			30'	60'	90'	120'	30'	60'	90'	120'	
1	4 marzo 2016	98%	>1000	95	43	27	>1000	>1000	>1000	>1000	
2	9 marzo 2016	95%	350	211	108	30	>1000	>1000	>1000	>1000	
3	30 marzo 2016	97%	122	70	42	16	>1000	>1000	>1000	>1000	
4	31 marzo 2016	97%	180	130	70	30	>1000	>1000	>1000	>1000	
5	13 abril 2016	98%	88	50	32	18	>1000	>1000	>1000	>1000	
6	14 abril 2016	96%	160	110	79	35	>1000	>1000	>1000	>1000	

ANEXO 11: ACTA DE RECEPCIÓN DE RESULTADOS Y RECOMENDACIONES.

Quito, ____ de _____ de 2016

CARTA DE RECEPCIÓN

Mediante la presente, Yo _____, con número de cédula C.I.: _____, administrador de la gasolinera _____, confirmo haber recibido los resultados de laboratorio de los pacientes enlistados a continuación, los mismos que fueron realizados durante el proyecto de investigación intitulado: *Valoración del sistema inmune y hematológico en trabajadores expuestos a componentes de la gasolina en estaciones de servicio de combustible de la ciudad de Quito, 2016.*

- XXXXXXXX
- XXXXXXXX
- ...

RECOMENDACIONES

En este estudio se ha evidenciado que existen alteraciones en las defensas y la producción de los componentes de la sangre de los despachadores de gasolina de las diferentes estaciones de combustible de la ciudad de Quito que participaron con el encomiable objetivo de conocer el estado de salud de sus trabajadores. Por esta razón nuestra recomendación es que su gasolinera tome la iniciativa en la adquisición y uso de mascarillas y otros equipos de protección que impidan la inhalación y el contacto directo con los vapores tóxicos de la gasolina, de este modo se estaría reduciendo el impacto dañino de estos químicos en la salud de los trabajadores antiguos como nuevos de su gasolinera. Asimismo, pueden acudir con cualquier médico de confianza y hacer uso de los exámenes de laboratorio entregados.

Una sugerencia de nuestra parte es que si les resulta muy difícil a los despachadores usar las mascarillas todo el tiempo de su turno por no poder comunicarse claramente con los clientes, pueden bajar su mascarilla un poco con la mano, hablar y colocarse nuevamente ó pueden analizar cuáles son las horas pico y mayor afluencia de automóviles que cargan gasolina en su estación de servicio para que el uso de estos equipos sea obligatorio durante estas horas.

Agradecemos su participación.
Atentamente,

Los autores

Nombre, firma y sello de recepción: _____

Nota: Como se mencionó al inicio del proyecto, todos los nombres de sus trabajadores y la gasolinera permanecen en estado anónimo.

ANEXO 12: GALERÍA DE FOTOS DE LOS AUTORES.

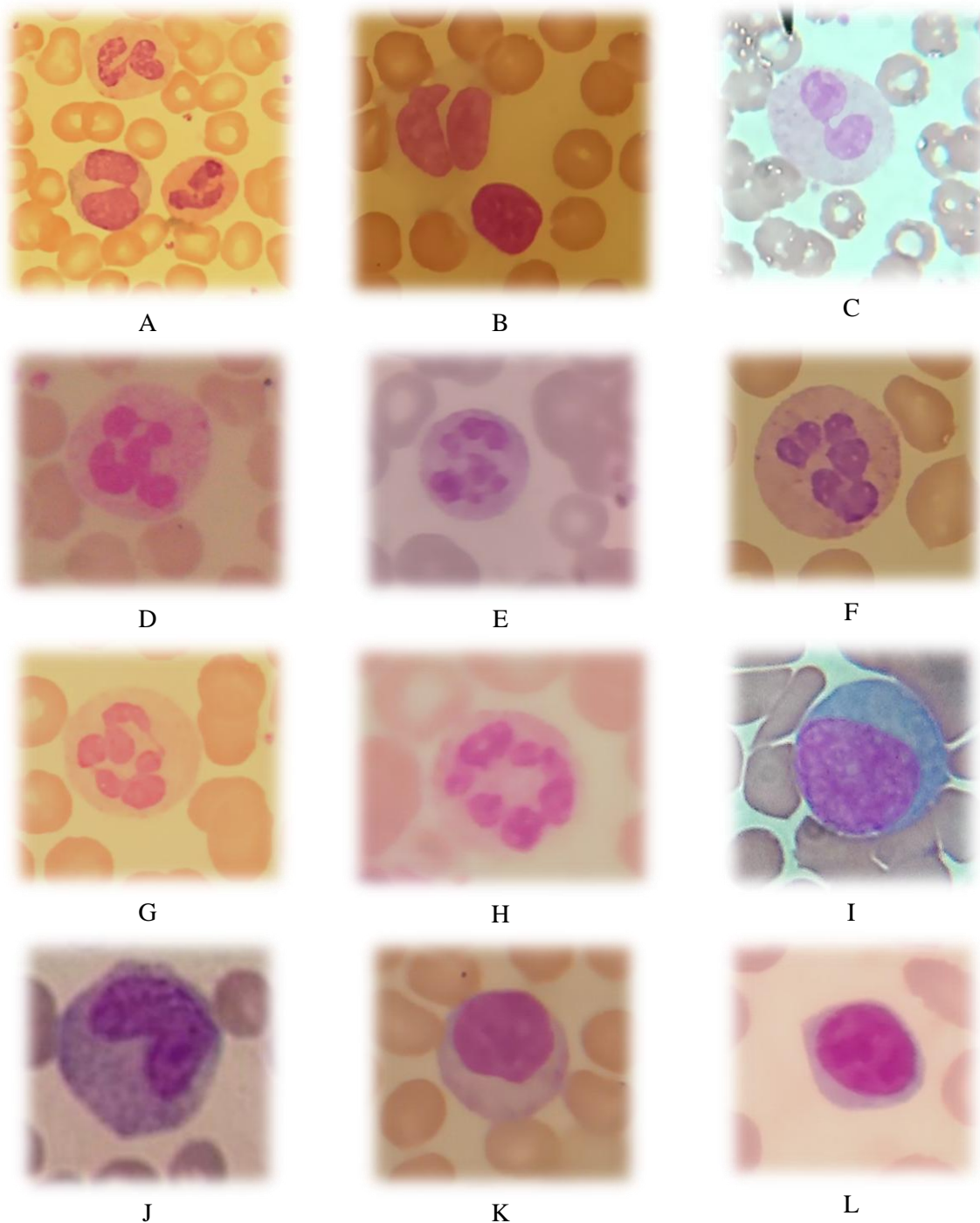


LÁMINA 1 – Serie Blanca.- Fotografías A, B, C muestran neutrófilos bilobulados; Las fotografías D – H son hipersegmentados de neutrófilo con 5 a 7 lóbulos; Las fotografías I y J muestran un mielocito y metamielocito respectivamente, en el mielocito se puede observar el nucléolo y el citoplasma basófilo; Las fotografías K y L son de linfocitos sin ninguna granulación citoplasmática. Todas las fotografías corresponden a extendidos de sangre periférica con tinción Wright y AT 1000X.

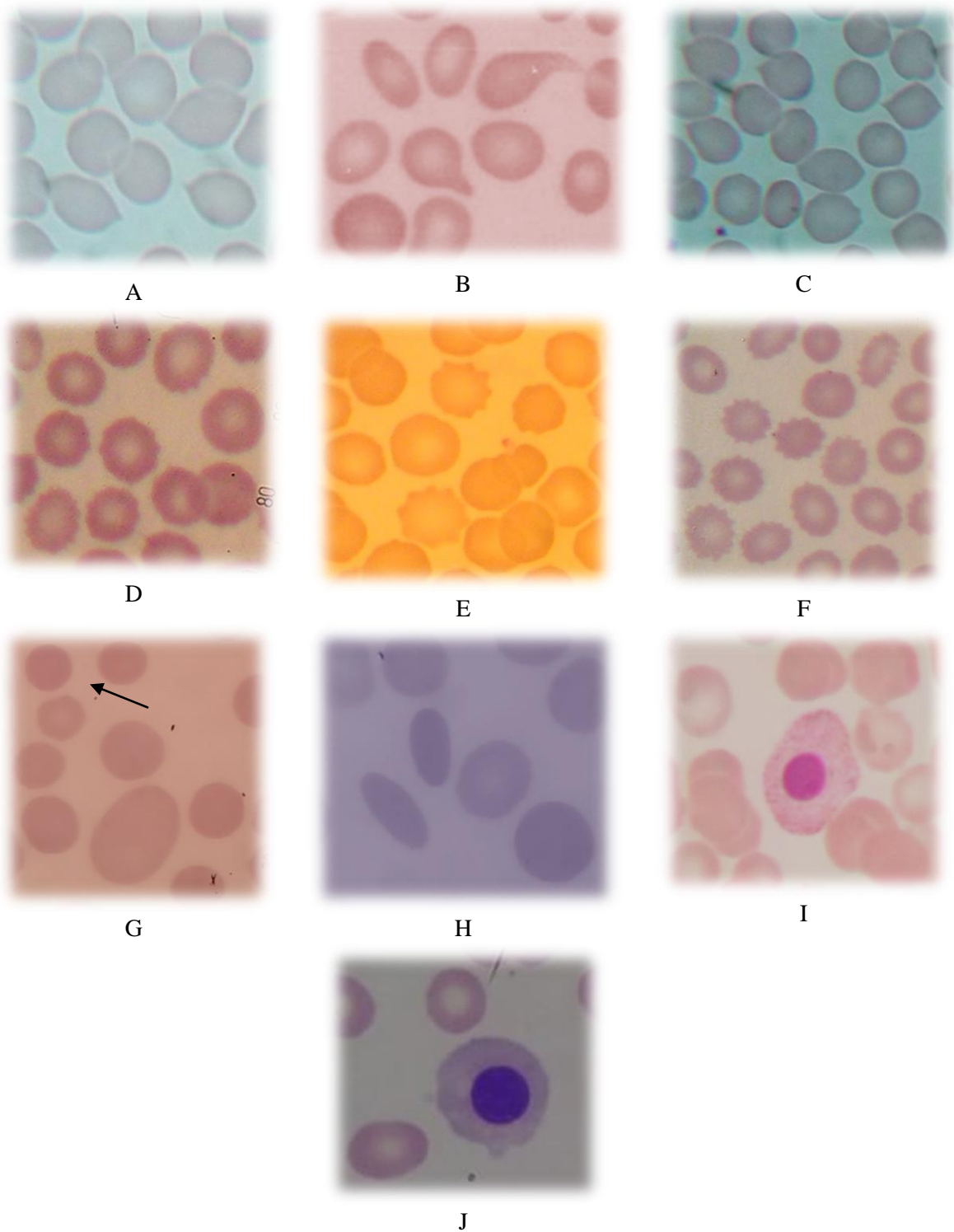


LÁMINA 2 – Serie Roja.- En las fotografías A, B y C se puede observar dacriocitos; Las fotografías D, E y F muestran equinocitos; Las fotografía G expone un caso de anisocitosis marcada donde se puede ver también un esferocito.; En la fotografía H se muestran eliptocitos; Las fotografía I y J son de eritroblastos ortocromáticos. Todas las fotografías corresponden a extendidos de sangre periférica con tinción Wright y AT 1000X.

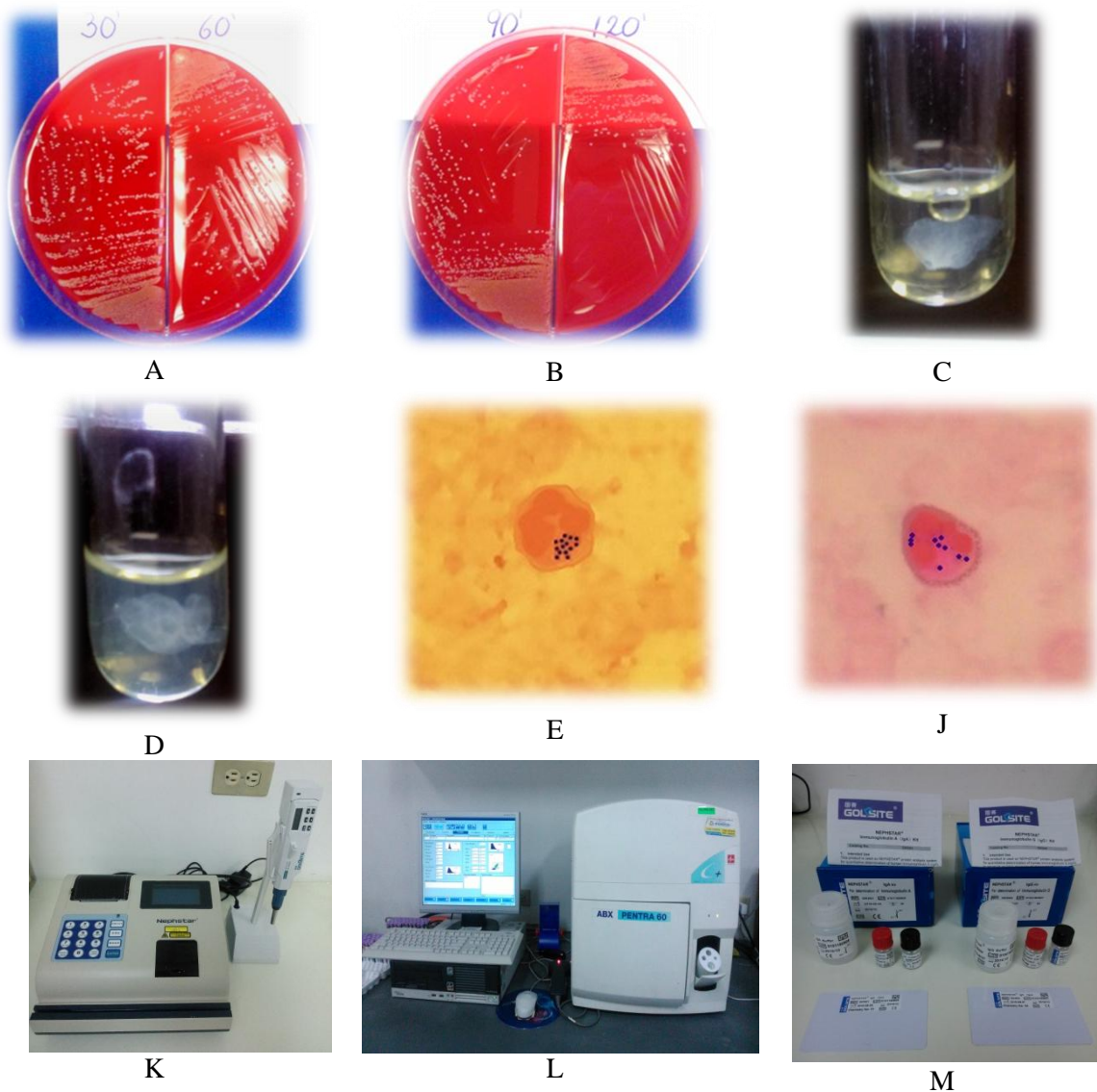


LÁMINA 3 – Procedimientos y materiales.- Las fotografías A y B corresponden a los resultados del ensayo fagocítico de un paciente, se puede notar que existe una relación inversamente proporcional entre tiempo y número de colonias, lo que indica una correcta función fagocítica de los PMN; Las fotografías C y D muestran los coágulos formados después de 24h del enfrentamiento de los PMN y las bacterias; Las fotografías E y J son tinciones GRAM de una muestra de la solución donde se encontraban los PMN enfrentados a bacterias *S. aureus* ATCC 25923. Se puede observar los núcleos del neutrófilo y también grupos de bacterias fagocitadas; En la fotografía K se presenta el nefelómetro Nephstar® *Specific Protein Analyzer* en el que se cuantificaron las inmunoglobulinas y en la fotografía M se muestran los KITS de IgA e IgG con sus respectivos buffer de reacción, control, antisuero y tarjeta de calibración; La fotografía L exhibe el contador hematológico automatizado ABX Diagnostics® Pentra 60.