

32
2 Gen



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

T E S I S



COMPARACION DE DOS METODOS PARA LA DOSIFICACION
DE HIERRO SERICO Y CAPACIDAD TOTAL DE FIJACION

ESCALONA ORTIZ BLANCA ESTELA

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1985



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	Pag.
1.- INTRODUCCION	1
2.- ANTECEDENTES	3
3.- OBJETIVO	4
4.- MATERIAL Y REACTIVOS	5
5.- CARACTERISTICAS DE LA MUESTRA	7
6.- HIERRO SERICO POR EL METODO ICSH	8
7.- CAPACIDAD TOTAL DE FIJACION POR EL METODO ICSH.	9
8.- HIERRO SERICO POR EL METODO L y M.	10
9.- CAPACIDAD TOTAL DE FIJACION POR EL METODO L y M.	13
10.- RESULTADOS: Exactitud	16
Precisión	17
Efecto de hemólisis	18
Sensibilidad	19
11.- DISCUSION	22
12.- CONCLUSIONES	23
13.- BIBLIOGRAFIA	30

INTRODUCCION

Aún cuando la medición de hierro no hemínico circulante fue introducida hace más de un siglo, continua siendo una determinación importante en el laboratorio clínico y de investigación. El hierro plasmático constituye solo una pequeña proporción de hierro total corporal, pero es clínicamente importante porque el plasma es la principal vía en el transporte del hierro interno. La medición de transferrina, la proteína específica de transporte de hierro en el plasma, es igualmente importante, porque los niveles de hierro sérico y transferrina son regulados independientemente, y no cambian en forma paralela en diferentes enfermedades. La información más importante se obtiene con la realización de las dos determinaciones: hierro sérico y capacidad total de fijación de hierro por la transferrina. La relación de éstos dos parámetros da el índice de saturación de la transferrina; considerado el índice más relevante de aporte de hierro para la médula eritroide y la mejor medida del intercambio entre el hierro plasmático y el tejido no eritroide.

Hay una variedad de técnicas para la determinación de hierro sérico. La espectroscopía de absorción atómica aumenta la sensibilidad de estas mediciones, pero el método colorimétrico se prefiere para propósitos clínicos. Las principales diferencias en los métodos publicados radican en el uso de: suero completo o desproteínizado, tipo de cromógeno y procedimiento manual o automatizado. En condiciones óptimas (con suero fresco normal), la elección de un método es particular no es crítico, debido a que los errores sistemáticos -

son pequeños en relación a la amplia variación diurna del hierro sérico observada en sujetos normales. Es de especial importancia usar un método que no sea afectado por la presencia de hemólisis en los sueros. Algunos métodos liberan cantidades significativas de hierro de hemoglobina el cual es medido colorimétricamente dando una falsa elevación del hierro sérico. Todos los métodos automatizados deben ser validados por comparación cuidadosa con el método recomendado por el Comité Internacional de Estandarización en Hematología (ICSH).

Existen varios métodos para la determinación de transferrina plasmática. El método tradicional en el laboratorio clínico se basa en la avidéz de la transferrina por el hierro inorgánico. Las mediciones colorimétricas miden la capacidad total de la transferrina para unir hierro, mientras que los métodos radioactivos miden la capacidad de fijación libre. En estos métodos se adiciona un exceso de hierro al suero y el hierro no unido a la transferrina es subsecuentemente eliminado por un adsorbente insoluble del hierro como el carbonato de magnesio. En varios laboratorios se prefiere medir la capacidad total de fijación y no la capacidad de fijación libre; la razón de ésto es porque una vez que es eliminado el exceso de hierro, la capacidad total de fijación se puede determinar colorimétricamente por el mismo método usado para la determinación de hierro sérico.

En el ensayo de hierro sérico con el método de ICSH se ha obtenido una satisfactoria concordancia interlaboratorio, sin embargo hasta la fecha no se ha encontrado un método clínico enteramente satisfactorio para cuantificar transferrina sérica. La dificultad para identificar un método de referencia adecua-

do para medir la capacidad de fijación de la transferrina estriba en el hecho que la mayoría de los ensayos se basan en la función de la proteína más que un análisis químico. La -- liofilización aparentemente altera la propiedad de la transferrina de unir hierro o probablemente la matriz sérica se altera en alguna forma.

Además de las consideraciones metodológicas la pregunta mas importante con respecto a la medición de hierro sérico y de capacidad total de fijación es su utilidad en el laboratorio clínico. En la actualidad se cuestiona el valor de estos parámetros tradicionales del estado de hierro en el organismo, debido al advenimiento de métodos más simplificados tales como protoporfirina eritrocítica libre y técnicas más específicas como ferritina sérica. Consideramos que es necesario reunir más experiencia con las mediciones de protoporfirina eritrocítica y ferritina sérica antes que el hierro sérico y la capacidad total de fijación sean reemplazadas.

AVANCE RECENTES:

El panel de expertos en las determinaciones de hierro, nombrado por el Comité Internacional para Estandarización en Hematología (International Committee for Standardization in Haematology ICSSH), publicó recientemente (1,2) los métodos de referencia para las mediciones de hierro en suero (FeS) y capacidad total de fijación de la transferrina (CTF). En el Instituto Nacional de la Nutrición (INN), desde 1968 se utiliza la técnica de Beale y cols (3), modificada por Loria y Monge (L y M) (4) para dosificar FeS, y la de Ramsay (5) modificada

por L y M para CTF. Para ambas determinaciones los métodos de L y M resultan más sencillos y con menos posibilidades de contaminación, ya que todo el procedimiento se realiza en un solo tubo, es decir, que no pasa a través de la serie de tubos que requieren las técnicas que precipitan proteínas antes de desarrollar color como es el caso del método de ICSH. El reactivo cromógeno en ambos métodos es la batofenentrolina sulfonada, así como el carbonato de magnesio para adsorber el hierro no unido a la transferrina.

OBJETIVO:

Con el objeto de validar la metodología empleada por nosotros en las determinaciones de FeS y CTF, decidimos compararla con los métodos recomendados por el ICSH, llevando simultáneamente un adecuado control de calidad que incluyo: precisión, exactitud y sensibilidad.

Para llevar a cabo la comparación de métodos se utilizaron sueros de pacientes de consulta externa y hospitalizados en el INN, a los que se les solicitaba determinaciones de FeS y CTF, parámetros que se determinaron simultáneamente con las dos técnicas mencionadas. Dichos estudios se realizaron en 64 sueros frescos excentos de hemólisis, lipemia e ictericia.

MATERIAL:

- a) Tubos de ensayo de 13 x 100 mm
- tubos de ensayo de 12 x 100 mm
- Pipetas de 5 ml

Pipetas de 1 ml
 Pipetas de 0.1 ml
 Matraces volumétricos de 250 ml
 Matraces volumétricos de 100 ml
 Matraces volumétricos de 50 ml
 Matraces volumétricos de 25 ml
 Vasos de precipitado de 200 ml
 Vasos de precipitado de 100 ml
 Frasco ambar

- b) Agitador "vortex"
 Balanza analítica
 Baño maría
 Centrífuga
 Espectrofotómetro Coleman Jr II
 Mechero
 Potenciómetro
 Rotador angular u otro mezclador
 Termómetro
 Sistema demineralizador "Deeminac" o "Deeminizer"
- c) Material de vidrio para destilación simple

REACTIVOS:

Alambre de hierro pureza no menor de 99.3%
 Acido tricloroacético menor de 280 mg/kg de hierro
 Acido tioglicólico
 Acido clorhídrico
 Acetato de sodio anhidro

Agua libre de hierro

4-7 difenil-1, 10 batofenantrolina disulfonatada
cloruro férrico

carbonato de magnesio $3\text{MgCO}_3\text{Mg}(\text{OH})_2\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en polvo

PREPARACION DE REACTIVOS: (ICSH)

1. Solución precipitante de proteínas. Solución acuosa que contiene 0.6 mol/l de ácido tricloroacético 0.4 mol/l de ácido tioglicólico y 1 mol/l de ácido clorhídrico. - Esta solución se debe almacenar en frasco oscuro y en estas condiciones permanece estable por dos meses. Para preparar 100 ml de esta solución pesar las siguientes cantidades: 9.8032 gm de ácido tricloroacético; 3.684 gm de ácido tioglicólico; 3.646 gm de ácido clorhídrico. Disolver y aforar a 100 ml con agua libre de hierro.

2. Solución cromógena. Acetato de sodio 1.5 mol/l y batofenantrolina (4,7- difenil-1, 10 batofenantrolina disulfonatada) 0.5 mmol/l
Para preparar 100 ml de solución cromógena pesar: 12.305 gm de acetato de sodio anhidro y 26.825 mg de batofenantrolina sulfonatada. Ambos reactivos se disuelven por separado y una vez disueltos se mezclan y se afora a 100 ml con agua libre de hierro.

3. Solución estándar de hierro de 8 mmol/l. Pesar 0.122 gm (2 mmol) de elemento de hierro (pureza no menor de 99.5%) y colocarlos en matraz volumétrico de 250 ml, adicionar

2 ml de ácido clorhídrico (7 mol/l) y aproximadamente 25 ml de agua, calentar el matraz con mechero hasta la disolución completa del alambre. Enfriar y aforar a la marca con agua libre de hierro.

4. Solución de cloruro férrico 1 mmol/l en ácido clorhídrico 50 mmol/l. Pesar 0.27 gm de cloruro férrico hexahidratado (de preferencia usar la sal proveniente de un frasco nuevo) disolver en 50 ml de ácido clorhídrico 1 mol/l y diluir con agua libre de hierro a 1 litro.
5. Solución saturante de hierro de 100 umol/l en ácido clorhídrico 5 mmol/l. En un matraz volumétrico de 250 ml colocar 25 ml de la solución de cloruro férrico 1 mmol/l y aforar a la marca con agua libre de hierro.
6. Carbonato de magnesio grado reactivo con fórmula aproximada: $3MgCO_3 \cdot Mg(OH)_2 \cdot 3H_2O$. Las propiedades de este adsorbente varían de acuerdo a la marca.

CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA:

Utilizando jeringa de plástico se extraen aproximadamente 10 ml de sangre venosa y se colocan en un tubo libre de hierro se deja a temperatura ambiente hasta obtener la retracción del coágulo y se centrifuga para separar el suero. Los sueros se conservan a $-20^{\circ}C$

Suero Control. Para este propósito se puede usar el remanente de los sueros previamente dosificados para FeS y CTP.

Se deben descartar sueros que presenten hemólisis, ictericia o lipemia. El volúmen obtenido se homogeneiza perfectamente, se centrifuga y se separa en alícuotas de 2.5 ml. Estos se congelan a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se dosifica una alícuota en cada lote de trabajo.

NOTAS:

El agua libre de hierro no debe contener más de 1.1 ug/dl de hierro. El agua destilada puede llenar este requisito, de no ser así se debe purificar pasándola a través de un filtro desmineralizador que contenga resina intercambiadora de iones. El ácido clorhídrico grado reactivo no debe contener más de 28 ug/dl de hierro.

El ácido tricloroacético conteniendo menos de 280 ug/kg de hierro se puede preparar destilando el ácido grado reactivo en equipo de vidrio.

Hierro sérico (ICSH)

Fundamento:

La determinación de hierro sérico por el método de ICSH se basa en una desproteización y reducción simultánea. Se separa el sobrenadante donde el complejo hierro transferrina se ha dissociado de ion Fe^{3+} a Fe^{2+} se adiciona el reactivo - cromógeno betafenantrolina sulfonada y se lee a 535 nm. Los estándares de hierro, el blanco y suero control son tratados de igual manera.

Técnica Hierro sérico. (ICSH)

1. Tomar 1.6 ml de suero y colocarlos en tubo de ensayo de

13 x 100 mm

2. Adicionar 1.6 ml de solución precipitante de proteínas.
3. Mezclar vigorosamente en agitador "vortex" durante 1 minuto.
4. Tapar los tubos con "parafilm" y colocarlos en baño maría a 56 °C por espacio de 15 minutos.
5. Centrifugar 20 minutos a 2500 rpm para obtener un sobrenadante libre de proteínas (ópticamente claro).
6. Tomar un mínimo de 2.1 ml del sobrenadante y colocar - 1 ml en cada una de dos celdillas de 12 x 75 mm.
7. Adicionar 1 ml de solución cromógena en cada celdilla y mezclar en el vortex.
8. Para el blanco colocar 0.5 ml de agua libre de hierro en cada una de dos celdillas agregar 0.5 ml de solución precipitante y 1 ml de solución cromógena.
9. Para los estándares tomar 2 alícuotas de 0.5 ml de solución de hierro de 40 $\mu\text{mol/l}$. Adicionar a cada una de ellas 0.5 ml de solución precipitante y 1 ml de solución cromógena.
10. Después de 5 minutos leer la densidad óptica de problemas y estándares contra un blanco a 535 nm.
11. $\text{FeS } \mu\text{mol/l} = \frac{\text{Absorbancia P} - \text{absorbancia B}}{\text{Absorbancia Std} - \text{absorbancia B}} \times 40$

P = suero problema

B = blanco

Std = estándar de hierro de 40 $\mu\text{mol/l}$

La absorbancia del blanco no debe exceder de 0.015 leída contra agua destilada en celdillas de 1 cm de diámetro.

Capacidad total de fijación. (ICSH)Fundamento.

Se basa en la saturación de transferrina sérica con solución de cloruro férrico, saturada la transferrina el exceso de hierro se adsorbe con carbonato de magnesio. Se centrifuga para separar el sobrenadante efectuando la determinación de hierro sérico.

Donde el complejo hierro transferrina se disocia, existiendo una desproteínización y reducción simultánea. Se separa el sobrenadante y se adiciona reactivo de color batofenantrolina - sulfonada se lee a 535 nm. Se incluye dos estándares, blanco y suero control.

Técnica capacidad total de fijación. (ICSH)

1. Tomar 1.3 ml de suero y colocarlos en tubo de 13 x 100 mm
2. Adicionar 1.3 ml de solución saturante de hierro (100 μ mol /l.
Mezclar en el "vortex", dejar en reposo por 20 minutos a temperatura ambiente.
3. Añadir 320 mg de carbonato de magnesio a cada tubo utilizando para ello un tubo de aproximadamente 8 mm de diámetro calibreado, taper con "parafilm", poner a rotación por 30 minutos (en rotador angular u otro mezclador adecuado).
4. Centrifugar por 20 minutos a 2500 rpm, separar el sobrenadante con ayuda de la propipeta.
5. Colocar 1.6 ml del sobrenadante en tubos de 13 x 100 mm y continuar la técnica para hierro sérico.

Hierro sérico. L y M

Fundamento.

El hierro presente en el suero se encuentra unido a una beta globulina, la transferrina. La unión hierro transferrina es estable a pH alcalino, pero se disocia totalmente a pH ácido. El método de medición aprovecha esta propiedad para separar el hierro de la transferrina al añadir un amortiguador - ácido. Una vez lograda la liberación del hierro, éste se mide espectrofotométricamente a base de agregar un agente cromógeno (batofenantrolina) que forma un compuesto colorido con el hierro ferroso.

Reactivos. (L y M)

1. Solución amortiguadora concentrada. Colocar 1.5 gm de glicina en un vaso de precipitados, disolver con aproximadamente 60 ml de agua y ajustar a pH 1.9 con HCl M. Pasar cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100ml y aforar con agua libre de hierro. Guardar refrigerado.
2. Solución amortiguadora de trabajo. A cada volúmen de amortiguador concentrado agregar dos volúmenes de solución acuosa de ácido ascórbico al 0.5% (esta última debe ser reciente). La cantidad de amortiguador que se prepara dependerá del número de celdillas que se vayan a trabajar ese día.
3. Batofenantrolina. Colocar 150 mg de batofenantrolina sulfonada (bathophenanthroline sulfonate) en matraz volú-

metrico de 25 ml. Aforar con agua y mezclar. Conservar a 4- 8 °C.

4. Solución madre de hierro. En matraz volumétrico de 250 ml colocar 175.5 mg de sulfato ferroso-amónico hexahidratado o 25 mg de alambre de hierro QP (pureza no menor de 99.5%) Agregar 1.25 ml de ácido sulfúrico concentrado y aproximadamente 75 ml de agua. Si se trata de alambre de hierro - calentar directamente en mechero hasta que se disuelva - completamente. Agregar gota a gota una solución diluida (aproximadamente 60 mg en 10 ml de agua libre de Hierro) de permanganato de potasio, hasta que la adición de una - gota le confiera a la solución un ligero tinte violeta. Aforar a 250 ml con agua. Esta solución es estable a temperatura ambiente y contiene 100 ug/ml de hierro.
5. Solución de hierro de 1.5 y 3.0 ug/ml. Colocar 1.5 y 3.0 ml de la solución madre de hierro, respectivamente, en - matraces volumétricos de 100 ml y aforarlos con agua.
6. Solución de hierro de 6 ug/ml. Colocar 6 ml de la solución madre de hierro en matraz volumétrico de 100 ml, y aforar con agua. Es estable a temperatura ambiente.
7. Carbonato de magnesio en polvo grado reactivo: fórmula - aproximada $3MgCO_3 \cdot Mg(OH)_2 \cdot H_2O$. En cada frasco nuevo, el operador deberá cercionarse de que el carbonato es capaz de fijar todo el hierro libre. Para ello, hacer una medición en que sustituya el suero problema por solución salina desde el paso 1 de la técnica.

Técnica Hierro Sérico. I y M

1. En celdillas de 12 x 75 mm colocar:
Celdilla blanco: 0.5 ml de solución salina
Celdilla estándar 1: 0.5 ml de solución de hierro de -
1.5 ug/ml.
Celdilla estándar 2: 0.5 ml de solución de hierro de
3.0 ug/ml
Celdilla problema: 0.5 ml de suero
2. Agregar 1.5 ml de solución amortiguadora de trabajo a todas las celdillas. Mezclar adecuadamente en "vortex" y dejar reposar 20 minutos.
3. Leer en espectrofotómetro a 530 nm la densidad óptica de las celdillas estándar y problema versus la celdilla blanco. Estas serán las DO-1 de estándares y problema.
4. Agregar 0.03 ml de batofenantrolina a todas las celdillas Mezclar Inmediatamente y dejar reposar 60 minutos.
5. Leer en las mismas condiciones del paso 3, la densidad - óptica de estándares y problemas versus celdilla blanco. Estas serán las DO-2.
6. Restar las DO-1 de las DO-2 en cada una de las celdillas estándares y problemas. Estas serán las DO netas.
7. Obtener los factores de las celdillas estándares 1 y 2.
Factor estándar 1 = 150 entre la DO neta del Std 1.
Factor estándar 2 = 300 entre la DO neta del Std 2.
8. Los factores deben ser similares. Promediar por la DO neta del problema para obtener el hierro sérico en ug/dl.

NOTAS:

Para sueros hemolizados es necesario evitar la liberación del hierro de la hemoglobina, para lo cual se recomienda leer inmediatamente después de agregar el amortiguador de trabajo. (inciso 2) y dejar reposar exactamente 60 minutos con el reactivo cromógeno antes de hacer la segunda lectura de densidad óptica.

Capacidad total de fijación. (L y M)Fundamento.

En el suero existe una beta globulina, la transferrina, que fija fuertemente el hierro, normalmente parte de la transferrina está unida a hierro y parte esta libre de hierro. Para medir la capacidad total de fijación (la de transferrina libre más la de transferrina unida a hierro), se agrega hierro en exceso al suero, y se incuba la mezcla para asegurarse que toda la transferrina libre queda unida a hierro. Después se agrega carbonato de magnesio y se centrifuga para separar el hierro libre en exceso (que quedará adsorto en el precipitado de carbonato) del hierro unido a transferrina (que estará contenido exclusivamente en el sobrenadante). Una dosificación de hierro en el sobrenadante permitirá conocer la capacidad total de fijación del suero problema.

El método puede considerarse en dos fases:

Fase I = Saturación de la transferrina con hierro, y eliminación del exceso de hierro no fijado por la transferrina.

Fase 2 = Medición del hierro en el sobrenadante utilizando para ello el método para medir hierro sérico.

Técnica Capacidad total de fijación. (L y M)

1. Colocar 1.0 ml de suero problema en tubo de 13 x 100 mm
2. Agregar 1.0 ml de solución de hierro de 6 ug/ml. Mezclar y dejar reposar 20 minutos.
3. Agregar aproximadamente 200 mg de carbonato de magnesio en polvo (se puede utilizar para ello una pipeta pasteur previamente calibrada). Mezclar vigorosamente, tapar el tubo y ponerlo a rotación durante 30 minutos.
4. Centrifugar (cabezal vertical) a 3000 rpm por 20 minutos
5. Extraer con propipeta un mínimo de 1.1 ml de sobrenadante y colocar 2 alícuotas de 0.5 ml de sobrenadante en -
caldillas de 12 x 75 mm.
6. Medir el hierro de los sobrenadantes siguiendo el método de hierro sérico, como si los sobrenadantes fueran sueros problemas.
7. El dato de concentración de hierro obtenido en los sobrenadantes se multiplica por 2 ya que el suero ha sido diluido 1:2 en la fase del proceso 1. El resultado de la multiplicación será la capacidad total de fijación en -
ug/dl y no deberá haber discrepancia entre los duplicados del suero.

RESULTADOS:

Exactitud. Para evaluar la exactitud de ambos métodos se hicieron pruebas de recuperación, adicionando cantidades conocidas de hierro a un suero de concentración conocida de hierro (42 ug/dl). Se hicieron dos experimentos y los resultados se presentan en la tabla 1.

TABLA 1. Pruebas de recuperación de hierro en dos experimentos por el método L y M e ICSH.

		<u>L y M</u>			<u>ICSH</u>		
Esperado		Obtenido		Esperado	Obtenido		
a)	ug/dl	ug/dl	%	ug/dl	ug/dl	%	
	78	78	100.0	69	69	100.0	
	108	111	102.7	102	100	98.0	
	202	211	104.4	228	219	96.0	
Promedio			102.3			98.0	
b)	93	93	100.0	96	97	101.0	
	132	127	96.2	124	128	103.2	
	172	166	96.5	162	167	103.0	
	203	201	99.0	190	193	101.5	
	239	230	96.2	227	225	99.1	
Promedio			97.2			101.5	

El promedio y recuperación en los dos experimentos para L y M fué de 99.95 y para ICSSH 99.75

PRECISION. Para establecer la precisión intraensayo se calculó el coeficiente de variación (CV) de las diferencias de las -- muestras problemas dosificadas por duplicado en el mismo día de trabajo (Tabla 2), y la precisión interensayo mediante el CV de un suero control conservado en alícuotas de 2.5 ml a -- -20 °C trabajado simultáneamente con los sueros problema (Tabla 2).

TABLA 2. Precisión en terminos de (CV) intra e interensayo para hierro sérico y para capacidad total de fijación.

		No.	<u>L y M</u> CV	No.	<u>ICSH</u> CV
Intraensayo	FeS	43	1.68	43	1.46
	CTF	43	1.10	43	0.51
Interensayo	FeS	22	5.0	7	6.38
	CTF	22	4.47	7	5.86

El CV intraensayo para FeS y CTF fué un poco menor para ICSSH que para L y M mientras que ocurrió lo contrario en el CV interensayo esto posiblemente ocurrió por el menor número de -- muestras control trabajadas por el método ICSSH. Sin embargo la precisión de ambos se encuentra dentro de lo esperado para métodos espectrofotométricos.

Efecto de hemólisis. A una mezcla de sueros frescos se le adicionó cantidades crecientes de un hemolizado (de concentración conocida) para obtener las concentraciones de hemoglobina -- (mg/dl) anotadas en la tabla 3. La técnica de L y M se trabajó con las modificaciones para sueros hemolizados (ver método).

TABLA 3. Efecto de hemólisis en las determinaciones de FeS y CTF por el método L y M e ICSH.

Hemoglobina mg/dl	FeS ug/dl		CTF ug/dl	
	L y M	ICSH	L y M	ICSH
0	41	42	263	316
96	43	52	262	314
192	46	94	257	314
288	46	126	261	340
384	48	-	302	361
479	58	231	324	392

En las determinaciones de FeS por el método de ICSH la presencia de hemoglobina a concentraciones de 96 mg/dl a 479 mg/dl se elevaron progresivamente las concentraciones de hierro en el suero y en el método de L y M solo hubo elevación cuando se adicionó 479 mg/dl de hemoglobina. Para CTF el efecto de Hemólisis se presentó para ICSH a concentraciones de hemoglobina de 288 mg/dl y para L y M de 384 mg/dl.

Sensibilidad. Para probar la sensibilidad se partió de un suero con concentración de Fe de aproximadamente 89 ug/dl y CTF de 333 ug/dl, con este suero se hicieron diluciones de : 1:2, 1:4, 1:6, 1:12, 1:24, en cada una de ellas se determinó FeS y CTF por los dos métodos.

Los resultados se pueden ver en la figura 1 donde se presentan los resultados obtenidos con el método L y M graficada en el eje de las abscisas la recíproca de cada una de las diluciones y en el eje de las ordenadas la concentración de Fe y CTF en ug/dl obtenida en cada dilución; como puede apreciarse los coeficientes de correlación para ambos parámetros fueron de 0.99

En la Figura 2 se muestra la gráfica obtenida con el método ICSH los resultados fueron muy similares a los obtenidos con el método L y M.

Comparación de los métodos L y M e ICSH en sueros problema.

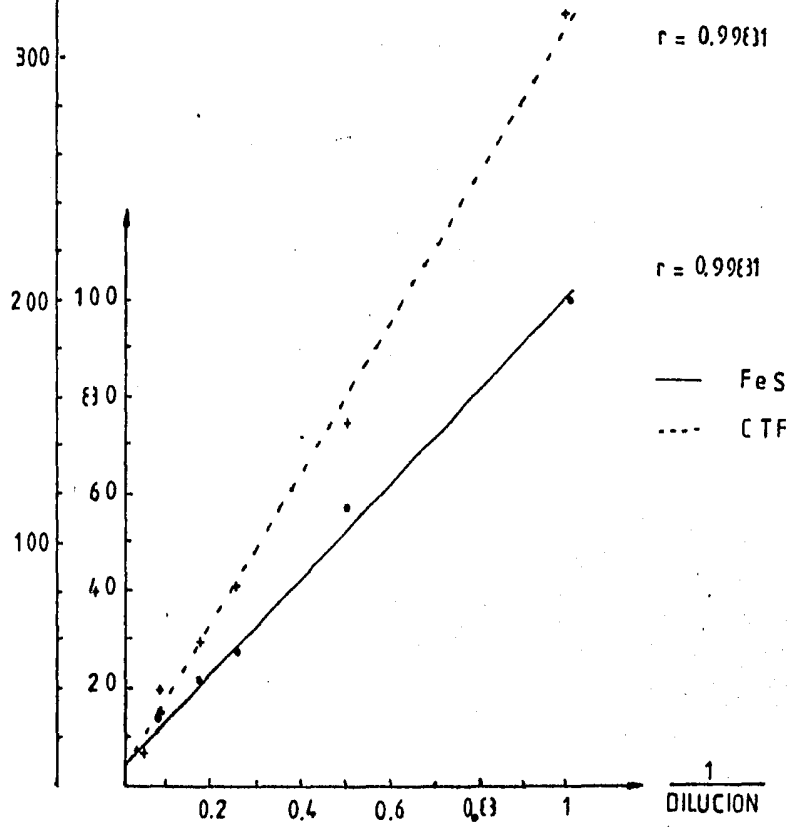
Esta se hizo en 64 sueros y en la Figura 3 se encuentran la correlación entre ambos métodos para la determinación de -- FeS, la recta de regresión fué: $y = -4.8988 + 1.0218x$ ($y =$ método ICSH; $x = L$ y M) con un coeficiente de correlación de - 0.979

En la Figura 4 se presenta la correlación en la determinación de CTF, donde la recta de regresión fué: $y = 11.687 + 0.9857x$ ($y =$ método de ICSH; $x = L$ y M) con un coeficiente de correlación de 0.976

En la tabla 4 se muestran los promedios y desviaciones estándar de FeS, CTF e índice de saturación de la transferrina

ug/dl

sensibilidad del metodo L y M



20

fig 1

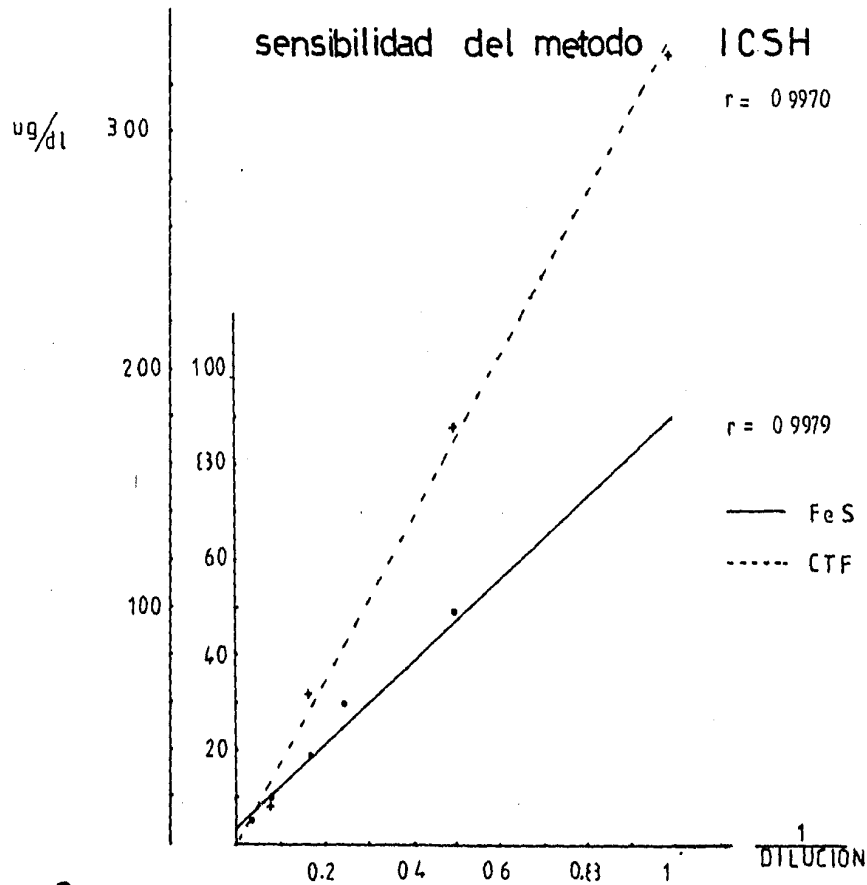


fig 2

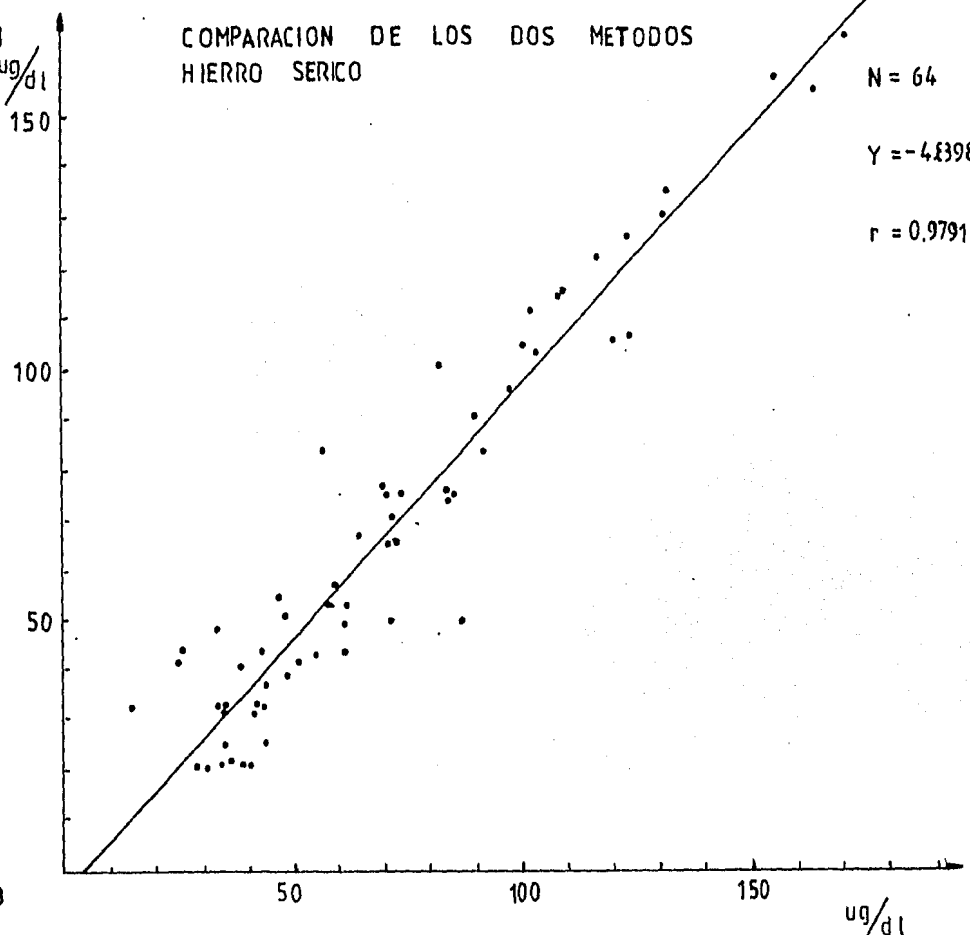
ICSH
ug/dl

COMPARACION DE LOS DOS METODOS
HIERRO SERICO

N = 64

$$Y = -4.83983 + 1021834 X$$

r = 0,9791



22

FIG 3

LY M
ug/dl

ICSH
ug/dl

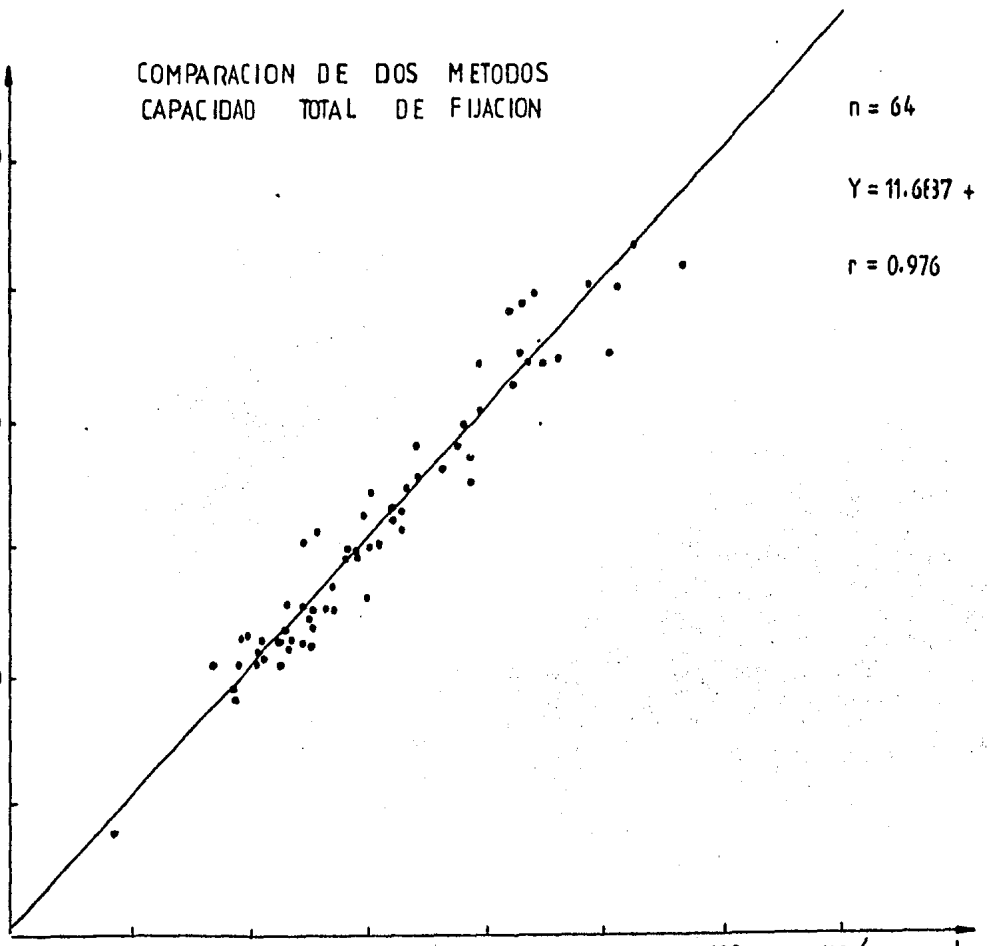
COMPARACION DE DOS METODOS
CAPACIDAD TOTAL DE FIJACION

n = 64

$$Y = 11.637 + 0.9357x$$

r = 0.976

600
400
200



23

FIG 4

LYM
ug/dl

Tabla 4

Resultados de FeS y CTF en 64 sueros trabajados simultáneamente con el método de referencia recomendado por el International Committee for Standardization in Haematology (ICSH) y por el de Loria & Longes (L & M).

Método	FeS				CTF				IS	
	ug/dl		umol/l		ug/dl		umol/l		%	
	x	DE	x	DE	x	DE	x	DE	x	DE
ICSH	73.7	± 49.1	13.2	± 8.7	321.1	± 102.6	57.3	± 18.3	28.4	± 22.0
L & M	76.9	± 47.0	13.7	± 8.4	313.8	± 101.0	56.0	± 18.0	30.6	± 22.1
t		2.5644				-2.5556				4.0652
p		0.01				0.01				0.0005

($IS = Fe \times 100 / CTF$) en los 64 sueros con las dos metodologías, la concentración se encuentra expresada en ug/dl y en umol/l. Aún cuando los promedios para FeS, CTF e IS fueron similares - con los dos métodos, las diferencias evaluadas mediante la -- prueba " t pareada " fueron significativas, es decir con el método de L y M los valores obtenidos para FeS e IS tendieron a ser más altos, mientras que los de CTF fueron más bajos en relación al método ICSH.

Analizando los pasos de cada una de las técnicas se encontró que en parte las diferencias observadas en las concentraciones de FeS, CTF e IS se podían atribuir a cambios de pH. Así en L y M el desarrollo de color con batofenantrolina en los estándares se lleva a cabo a pH 2.2 y se observó que elevando el pH a 2.8 (que es el que se obtiene en el sistema suero-amortiguador-batofenantrolina) ocasionaba un pequeño ascenso en las lecturas de densidad óptica, y consecuentemente una disminución en el factor (ver método). Esto explicaba los valores de FeS más altos obtenidos con el método L y M. Por otro lado se sabe que el pH óptimo (6) de unión Fe^{3+} - transferrina es 7.45

Los pHs de unión en L y M e ICSH son 6.9 y 7.7 respectivamente. Así estas diferencias en pH podían ser las responsables para los valores de CTF más bajos observados en L y M debido a una saturación incompleta de la transferrina con el hierro. - Por lo anterior se decidió trabajar otros 15 sueros con ambos métodos e introduciendo dos modificaciones en el método de L y M amortiguador glicina-HCl pH 2.5 para llevar a cabo el desarrollo de color de estándares (la mezcla estándar, amortiguador, batofenantrolina de pH 2.8). Además se usó la solución

de cloruro férrico de 100 $\mu\text{mol}/\text{l}$ (ver métodos) para saturar la transferrina.

En la Tabla 5 se muestran los promedios y desviaciones - estándar para FeS, GTF e IS en 15 sueros y como puede verse ya no hubo diferencias estadísticamente significativas cuando se analizaron con la prueba " t pareada".

DISCUSION:

Se acepta que para establecer la etiología de la anemia resulta de gran utilidad las determinaciones de FeS y GTF esta última como medida indirecta del nivel de transferrina en el suero, sin embargo las variaciones interlaboratorio en la medición de GTF son más grandes que las observadas en la cuantificación de otros constituyentes del suero. Los problemas relacionados con la medición de GTF han sido revisados recientemente por Williams y Vander Heul (7,8) y en un trabajo realizado por el Colegio Americano de Pátólogos (9) con la participación de 1100 laboratorios, se encontró que los resultados de GTF - son dependientes del método, pero que existe una amplia variación entre los grupos para un mismo método. En este mismo estudio se reportan coeficientes de variación interlaboratorio de 14- 31 % de acuerdo al método.

En terminos generales podemos afirmar que en nuestras manos los dos métodos comparados en el presente trabajo tienen sensibilidad y precisión similares. Por otro lado consideramos que por lo que se refiere a precisión interensayo nuestras mediciones de FeS con el método ICSH son comparables a las obtenidas por 2 laboratorios del panel de expertos ya que el coefi

Tabla 5

Resultados de FeS y CTF en 15 sueros trabajados simultaneamente con el método de referencia recomendado por el International Committee for Standardization in Haematology -- (ICSH) y por el de Loría & Monge (L & M) modificado *

Método	FeS				CTF				IS	
	ug/dl		umol/l		ug/dl		umol/l		%	
	x	DE	x	DE	x	DE	x	DE	x	DE
ICSH	93.9	71.5	16.76	12.76	298.4	77.36	53.28	13.81	35.1	27.1
L & M	95.8	68.8	17.10	12.28	293.6	77.34	52.42	13.82	35.4	25.59
t			0.6135				-1.2077		0.3930	
p			NS				NS		NS	

27

* ver texto

ciente de variación informado por ellos (1) de aproximadamente 6.5% (calculado con promedio y desviación estándar) compara favorablemente con el obtenido por nosotros de 6.4% (Tabla 4).

Con respecto a la comparación de resultados de FeS y CTF en sueros problema aún cuando los promedios fueron muy similares se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, que se pudieron explicar y aparentemente corregir mediante dos modificaciones en la técnica de L y M. Posiblemente una de las ventajas del método de L y M reside en que los errores introducidos en la determinación de FeS por la presencia de hemoglobina libre en el suero son más pequeños que los observados con el método ICSH, y de hecho el panel de expertos (2) recomienda que la concentración de hemoglobina en sueros de referencia no exceda de 3 mg/dl. Por todo lo anterior consideremos que, validado por pruebas de precisión, sensibilidad y exactitud el método de L y M, con las dos modificaciones propuestas en este trabajo, es comparable al método recomendado por el ICSH.

CONCLUSIONES:

- 1.- Mediante pruebas de precisión (intra e interensayo) y sensibilidad se demostró la comparatividad de los dos métodos L y M e ICSH para cuantificar FeS y CTF.
- 2.- Los promedios y desviaciones estándares de FeS y CTF en 64 sueros obtenidos con los dos métodos fueron semejantes pero existieron diferencias estadísticamente significativas.
- 3.- Se comprobó que dichas diferencias desaparecían (en 15 sueros) modificando la técnica de L y M en dos pasos que

el pH.

4.- Se demostró que en sueros hemolizados se afectan menos las determinaciones de FeS y CTF con el método de L y M que - con el método ICSH.

BIBLIOGRAFIA:

- 1.- International Committes for Standardization in Haematology. The measurement of total and unsaturate Iron-Binding Capacity in serun. Brit J of Haematology 38; 281, 1978.
- 2.- International Committes for Standardization in Haematology. Recomendadions for measurement of serun iron in human blood. Brit H. Haematology. 38;291,1978.
- 3.- Beale, R. N., Bostrom, J.O. & Taylor, R. F. : Improved-rapid methods for the determination of iron content and binding capacity of serun J Clin Path 15; 156, 1962.
- 4.- Loría, A. y Monge, B. Técnicas de dosificaciones séricas de hierro y de capacidad de fijación de hierro. Rev Invest Clin. 20; 429,1968.
- 5.- Ramsay, W. N. M. : The determination of the total iron binding capacity of serum. Clinica Chim Acta 2, 221, 1975.
- 6.- Pránciotto, J.V. & Zapolski, E.J. Difference between the two iron-binding sites of transferrin nature 255; 87,1975.
- 7.- Williams, H.L., Conrad, M.E. Problems in the measurement of iron-binding capacity in serum Clin Chem Acta 37; 131, 1972.
- 8.- Van der Heul C. Van ejik W F Wiltink W.F. et al: The bin-

ding of iron to transferrin and to other serum component at diferent degree of saturation with iron Clin Chem Acta 38; 347, 1972.

- 9.- Itano, M. College of American Pathologists comprehensive chemistry survey bonus option. Am J Clin Pathol 66; 244, 1976.