



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO COMPARATIVO DE CINCO METODOS
PARA DETERMINAR FIBRINOGENO EN PLASMA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

TESIS

Que para obtener el título de
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

p r e s e n t a

ELOISA TELIZ SANDOVAL

México, D. F.

1982



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO COMPARATIVO DE CINCO METODOS PARA DETERMINAR

FIBRINOGENO EN PLASMA

T E S I S

Nombre del sustentante: ELOISA TELIZ SANDOVAL

Carrera : QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1 9 8 2

te la acción de la trombina que efectúa específicamente provocando la ruptura de la arginil-glicina-, liberándose dos pares de fibrinopéptidos A y B que forman como producto final el monómero de fibrina; la presencia de estos fibrinopéptidos, los cuales tienen carga electro-negativa, impide su polimerización ya que actúan fuerzas repelentes. Según Laki (1925)²⁵, las condiciones iónicas determinan el tipo de agregación. La agregación terminoterminal se realiza predominantemente a un pH de 8, y la agregación laterolateral es más frecuente a pH de 6.5. En presencia de factor XIII (Factor estabilizador de la fibrina)²³, los agregados de fibrina forman enlaces cruzados mediante un mecanismo de transpeptidización (Lorand, 1965)²⁷.

A diferencia de la trombina que separa rápidamente los fibrinopéptidos de la molécula del fibrinógeno, la plasmina sólo los libera después de una muy prolongada y extensiva digestión.

Los productos de desintegración que resultan de la acción de la plasmina sobre el fibrinógeno (fig. 2), son diferentes al monómero de fibrina que resulta de la acción de la trombina.

Actualmente, se les designa como productos de degrada-

ción del fibrinógeno FDP, a los que resultan de la acción proteolítica de la plasmina, productos que actúan inhibiendo la acción de la trombina interfiriendo en la conversión del fibrinógeno en fibrina.

ASPECTOS GENETICOS DEL DEFICIT DE FIBRINOGENO

AFIBRINOGENEMIA. Se encuentra raramente como trastorno congénito, falta totalmente el fibrinógeno del plasma tanto si se busca para ensayo de coagulación como para técnicas inmunológicas. Curiosamente este trastorno se acompaña de menos hemorragias espontáneas que algunas de las otras deficiencias hereditarias de los factores de la coagulación. Sin embargo, la hemorragia después de una lesión importante es grave en este trastorno, puesto que la sangre es totalmente incoagulable⁴¹.

DISFIBRINOGENEMIA. Además de la ausencia de fibrinógeno ocurren formas de fibrinógeno anormales sobre una base hereditaria, por lo general autosómica dominante. Generalmente, son caracterizados por coagularse a un ritmo anormalmente lento. Es característico que el grado de polimerización del monómero de fibrina esté reducido, pero en algunos casos se ha registrado una liberación desordenada de fibrinopéptido de la molécula del fibrinógeno. Los análisis fisicoquímicos diferencian estos fibrinógenos so

bre la base de su movilidad electroforética, características de filtración y constitución química. Por ejemplo, en el caso del fibrinógeno Detroit, se ha detectado una sustitución de aminoácidos en la parte terminal -N- de la cadena (serina en lugar de arginina) y esto puede explicar la reactividad alterada de la molécula aún cuando difería también aparentemente del fibrinógeno normal por su contenido en hidocarbonados. Cada trastorno representa posiblemente otras sustituciones diferentes de esta clase, cuya definición aguarda ulteriores investigaciones. Los enfermos con estas disfibrinogenemias suelen, por lo general, tener solamente síntomas hemorrágicos ligeros¹¹

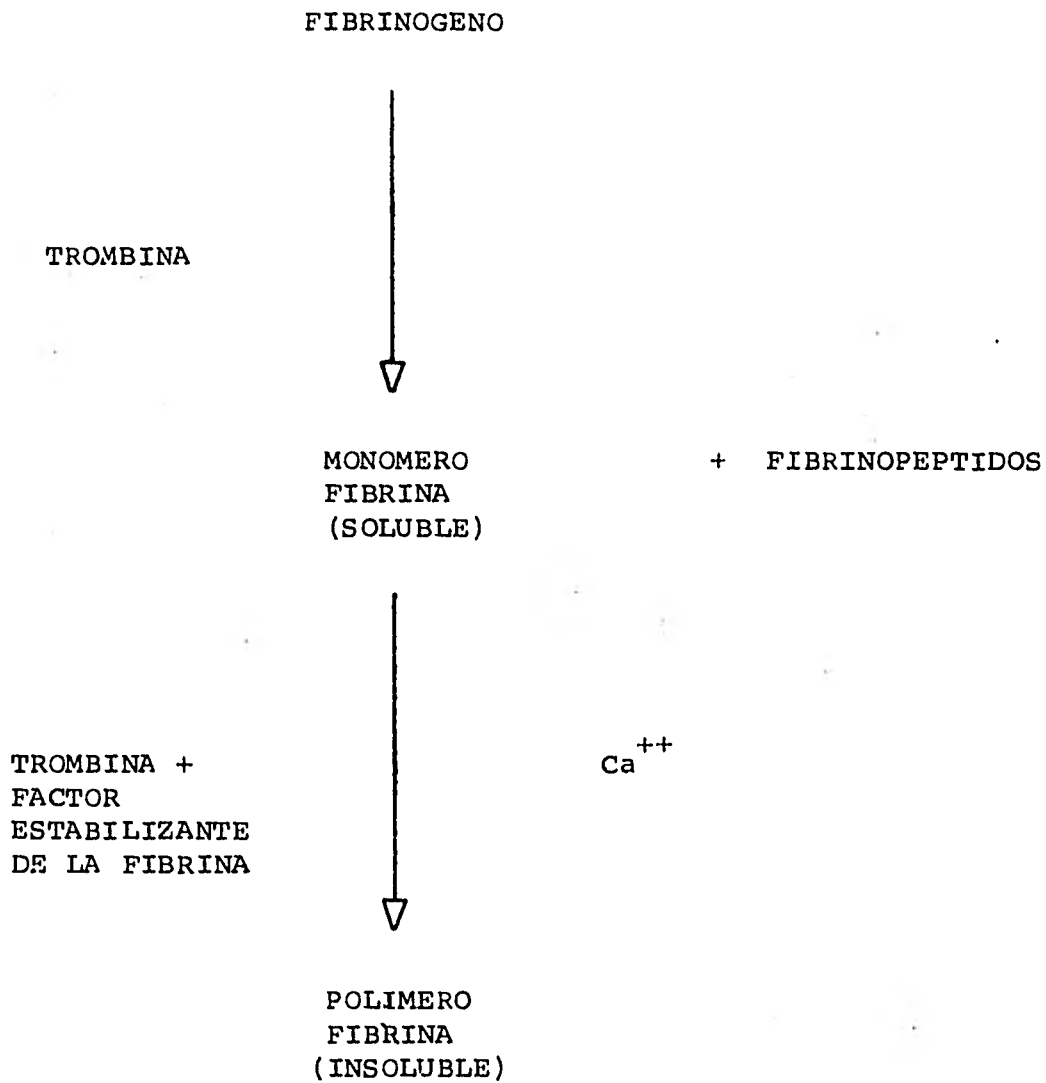
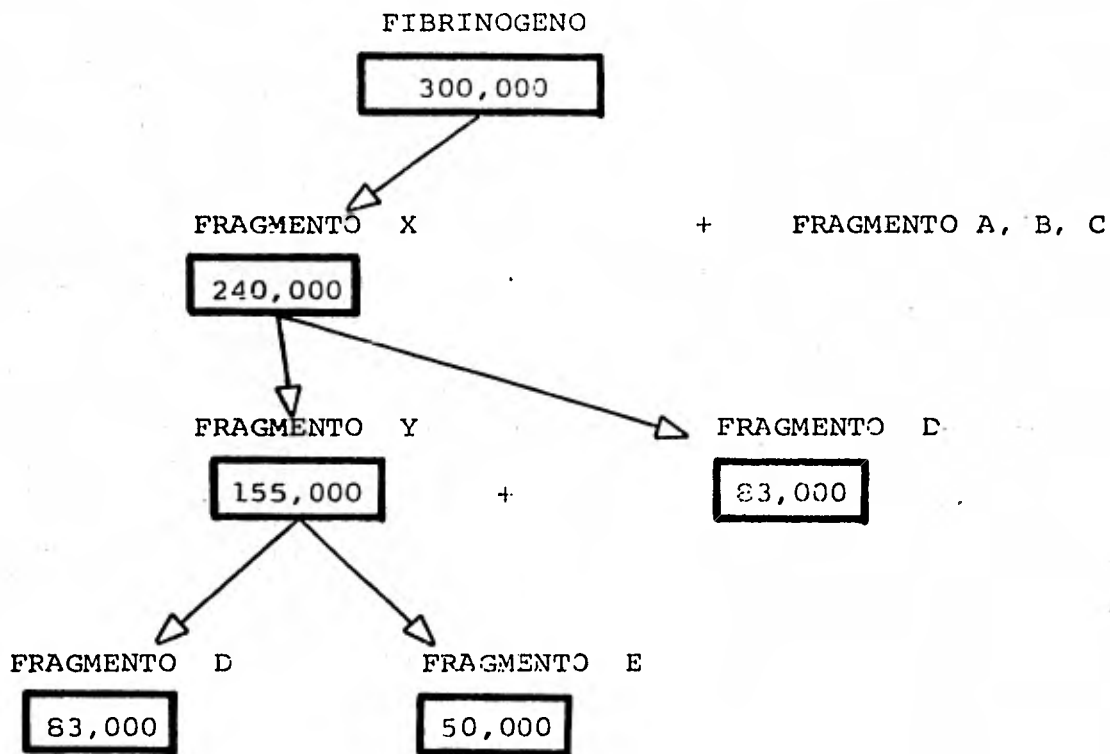


Fig. 1 Conversión del fibrinógeno en el polímero fibrina.

Figura 2



Esquema de la segmentación asimétrica del fibrinógeno por plasmina (Marder, 1970).

CAPITULO III
MATERIAL Y METODOS

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO PARA LA DETERMINACION DE FIBRINOGENO

Las muestras fueron extraídas de la vena cubital, en la mañana y teniendo por lo menos ocho horas de ayuno completo; se utilizaron agujas del No. 20 y jeringas siliconizadas. Se evitó en lo posible la contaminación con tromboplastina tisular por lo que se trató de no hacer presiones extremas del torniquete y punciones traumáticas, descartándose las sangres provenientes de venipunturas imperfectas.

Las muestras fueron transferidas a tubos siliconizados que contenían como anticoagulante citrato de sodio al 3.8 %, pH 6.4 en proporción de nueve partes de sangre por una de anticoagulante.

La sangre citrada se centrifugó a 3,000 rpm, durante 30 minutos. El plasma pobre en plaquetas así obtenido, se transfirió en otro tubo siliconizado limpio.

A cada muestra se le hicieron determinaciones simultáneas de las siguientes pruebas:

1. Determinación de Fibrinógeno por cinco métodos.
2. Productos líticos, FI-TEST, Tiempo de Trombina, Etanol y Precipitación con Protamina.

Las determinaciones de productos l ticos, FI-TEST, Tiempo de Trombina, Etanol y Precipitación con Protamina se hicieron con el objeto de relacionar estas determinaciones con la cuantificación de fibrinógeno.

Se estudiaron cien muestras de sangre de personas con diversos padecimientos como son:

- a) Cirrosis Hepática
- b) Coagulación Intravascular
- c) Hodgkin
- d) Insuficiencia Renal
- e) Leucemias
- f) Lupus Eritematoso
- g) Septicemias

También se trabaj  con testigos voluntarios normales a los que se les practicó el mismo grupo de pruebas, este material humano provenía fundamentalmente del personal médico y de laboratorio.

Cabe mencionar que las pruebas se hicieron por duplicado y siempre comparándolas con un testigo normal obtenido de la mezcla diaria de varios plasmas de donadores profesionales del Banco de Sangre del Centro Médico Nacional. Además, la reproductibilidad de los cinco métodos fue determinada en la mezcla de donadores profesionales.

DETERMINACION DE FIBRINOGENO

PROCEDIMIENTO TURBIDIMETRICO (METODO DE PARFENTJEV, MODIFICACION DE FOWELL).

Principio:

El fibrinógeno es precipitado por la adición de un exceso de una sal $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, y a medida que se forma el precipitado se transmite menor cantidad de luz, la que se detecta con un fotocolorímetro, obteniendo una correlación entre la densidad óptica y la concentración de fibrinógeno¹⁷.

REACTIVOS:

- a) Reactivo de Fibrinógeno
- b) Estándar de Fibrinógeno

EQUIPO:

1. Cubetas (Coleman)
2. Coleman Junior Espectrofotómetro, modelo 6A
3. Cronómetro

TECNICA:

1. En un tubo de fotocolorímetro se ponen 0.5 ml de plasma. Agregar 4.5 ml de Reactivo de Fibrinógeno. Mezclar.

2. Si el plasma se encuentra hemolizado o icterico,- conviene preparar un blanco, mezclando 0.5 ml de plasma problema y 4.5 ml de solución salina isotónica.
3. Reposar 4 minutos. Hacer la lectura en el fotocolorímetro a 520 mμ, poniendo en 0 con el blanco. Buscar el equivalente expresado en mg en la curva de calibración.
4. La curva de calibración se prepara diluyendo el fibrinógeno estándar con la solución salina a distintas concentraciones.
5. Se lee en el fotocolorímetro con filtro de 520 m.μ. anotando las lecturas en densidad óptica obtenidas para cada una de las concentraciones.
6. Los datos se grafican en papel milimétrico, en el eje de las abscisas, se ponen las concentraciones y en el eje de las ordenadas las lecturas en densidad óptica. Los puntos obtenidos se unen mediante una recta (la que mejor corresponda a la mayoría de dichos puntos).

PREPARACION DEL REACTIVO DE FIBRINOGENO

En un matraz aforado de 1,000 ml disolver en agua desti-

lada 133.33 gr de sulfato de amonio; 10.0 gr. de NaCl y
0.025 ml de mertiolate. Aforar hasta la marca con agua
destilada y ajustar a pH 7.0 con NaOH, 10 M.
Valores de Referencia 200-400 mg %.

DETERMINACION DEL FIBRINOGENO MEDIANTE PRECIPITACION --
POR CALOR

(Ruíz Reyes y Jiménez Vázquez)

Principio:

Se basa en la precipitación del fibrinógeno por la acción del calor, centrifugación y medición del mismo³⁶.

MATERIAL Y EQUIPO:

- a) Centrífuga Microcapilar
- b) Baño María a $58^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- c) Ocular de Microscopio 10X
- d) Reglilla en microescala
- e) Mechero

METODO:

En un tubo capilar se marcan 4 cm y se llena con el plasma a estudiar hasta ese nivel, cerrando un extremo mediante calor; hay que centrifugar un minuto para que el plasma se empaque perfectamente en el extremo cerrado, una vez que se ha centrifugado se cierra también el otro extremo mediante calor. El tubo capilar se introduce al baño de agua, checando que la temperatura sea de $58^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos, y cuidando que el nivel de agua sobrepase el del plasma.

Centrifugar el capilar durante 3 minutos, de esta manera el fibrinógeno precipitado se empaca en el fondo del capilar, el cual, a su vez, se introduce en la canaladura de la placa de lucita y mediante observación con un ocular de microscopio 10X invertido, se hace coincidir el fondo del capilar con el 0 de la escala. Se mide la altura del precipitado del fibrinógeno (H.F.) y la altura del plasma (H.P.) y los cálculos se llevan a cabo mediante la siguiente fórmula:

$$100 (H.F./H.P.) = \text{FIBRINOCRITO}$$

El fibrinocrito multiplicado por 92.4 nos da la cantidad de miligramos de Fibrinógeno. La constante de 92.4 puede variar para cada laboratorio según la escala usada en la reglilla y el número de muestras control empleadas, ya que para este método, los autores del mismo, al proponerlo, hicieron simultáneamente cuantificaciones de Fibrinógeno, con el procedimiento de Quick o cualquier otro método de determinación del mismo que sea reproducible.

Valores de referencia: 200 a 400 mg %.

Con todo mi amor a

Ricardo

Con cariño a Manin y a Naty

Por su cariño y comprensión a

mi tía Lola.

Con sincero afecto a mis Tios

y Primos.

Con estimación a mis

compañeros y amigos.

Al H. Jurado:

Por su cooperación la que
en una u otra forma pres-
taron para llevar a feliz
término mi tesis.

A mi Asesor:

Q.B.P. Raúl Nieto C.

Por su colaboración y valiosa
ayuda sin la cual este trabajo
hubiese quedado truncado.

Con agradecimiento al Dr. Javier
Pizzuto, Jefe del Servicio de Hema-
tología del Hospital General del -
Centro Médico Nacional por haber -
hecho posible la realización de es-
te trabajo. A la QFB. Ma. de la Paz
Reyna, del Laboratorio de Coagula-
ción y a la Srta. Martha Sánchez
del Depto. de Informática Médica,
por su colaboración y ayuda.

I N D I C E

CAPITULO I	-	INTRODUCCION
CAPITULO II	-	GENERALIDADES
CAPITULO III	-	MATERIAL Y METODOS
CAPITULO IV	-	RESULTADOS Y DISCUSION
CAPITULO V	-	CONCLUSIONES
CAPITULO VI	-	BIBLIOGRAFIA

CAPITULO I

INTRODUCCION

INTRODUCCION

La disponibilidad instantánea de valores de fibrinógeno exactos se ha convertido en una necesidad urgente en la práctica médica durante los últimos años. La determinación del fibrinógeno plasmático es aceptada universalmente como una prueba biológica útil para el diagnóstico, tratamiento y pronóstico de ciertos desórdenes hemorrágicos^{1,29,39}

Los procedimientos para la determinación del fibrinógeno pueden ser clasificados en dos formas: 1) La semicuantitativa, que es la observación del coágulo. En este caso, se estima la cantidad de fibrinógeno de una muestra de sangre por la velocidad de formación del coágulo⁴²; y 2) La cuantitativa. Es a menudo más razonable el trabajar con plasma, porque aún a concentraciones muy bajas de fibrinógeno, éste puede detectarse satisfactoriamente. Hay muchos métodos para la determinación del fibrinógeno en plasma^{12,19,20}. Entre los cuales los más usados incluyen los nefelométricos basados en la precipitación salina³⁴, la precipitación térmica¹⁶, el contenido en nitrógeno o tirosina¹⁵, determina--

ción enzimática³⁰, método gravimétrico (aislamiento de la fibrina, la cual es extraída, lavada, desecada, pesada, calcinada y vuelta a desecar hasta un peso constante), etc.

En el presente trabajo, utilizaremos los siguientes métodos para determinar el fibrinógeno: a) como una proteína coagulable, utilizando el reactivo Fenólico de Folín Ciocalteau (método de Ratnoff-Menzie); b) como una proteína precipitable por la adición de un exceso de sal (método de Parfentjev, modificación de Fowell); c) por datos cinéticos basados en la conversión de fibrinógeno a fibrina en presencia de trombina (método basado en observaciones hechas por Claus, en que el tiempo de coagulación del plasma por concentraciones bajas de trombina son muy sensibles a los cambios de concentración de fibrinógeno; d) por precipitación térmica de Ruíz Reyes y Jiménez; y e) por inmunodifusión radial.

Estos métodos son evaluados en términos de reproductibilidad, confiabilidad, sencillez y exactitud; con el propósito de encontrar una técnica accesible para la práctica diaria basándose en lo anteriormente menciona

do e igualmente encontrar la más exacta, independiente
mente de su laboriosidad para la determinación de fi--
brinógeno en los casos especiales.

CAPITULO II

GENERALIDADES

GENERALIDADES

El fibrinógeno es una proteína de peso molecular de - - aproximadamente 340,000 la cual es sintetizada en el higado. Existe en el plasma de los sujetos normales de - 200 a 400 mg % es el único factor (Factor I) de la coagulación que se encuentra en cantidad suficiente que -- permite su medición. Su función más importante está en la coagulación de la sangre, cuando es transformada en fibrina por acción de la trombina⁸.

La molécula es elongada y constituida por tres cadenas de polipéptidos (α, β, δ) unidas por puente disulfuro. Al microscopio electrónico, la molécula se ha descrito como poseedora de tres subunidades globulares entre las cuales se hallan estrechas secciones de enlace; que en conjunto son susceptibles a la acción de dos enzimas existentes en la sangre: la trombina y la plasmina. La activación de cualquiera de estas enzimas in vivo puede provocar la destrucción del fibrinógeno circulante y la consecuente aparición de sus productos de degradación en el torrente sanguíneo².

El fibrinógeno se transforma en fibrina (fig. 1) median

DETERMINACION DE FIBRINOGENO POR COAGULACION

(Método de Ratnoff - Menzie)

Fundamento:

Se ha observado que el fibrinógeno contiene tirosina de manera relativamente constante.

El fibrinógeno del plasma es convertido en fibrina por la acción de la trombina. La fibrina situada sobre el cristal es lavada, se hidroliza al hervirse con hidróxido de sodio y su contenido en tirosina es cuantificado por la adición del reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu, dando una coloración azul que es proporcional a la cantidad de tirosina presente, la que se determina en un colorímetro³⁵.

MATERIAL:

1. Tubos de 40 ml de fondo redondo
2. Vidrio molido
3. Agitador de vidrio
4. Celdillas de 12 X 75 mm
5. Fotocolorímetro
6. Baño María en ebullición
7. Solución salina

8. Tromboplastina
9. Cloruro de calcio 0.02 molar
10. NaOH al 10 %
11. Agua destilada
12. Na_2CO_3 al 20 %
13. Reactivo de Folin-Cioacalteau
14. Estándar de Tirosina (200 mg/lt en HCl 0.1N)

METODO:

1. En dos tubos de 40 ml de fondo redondo se coloca - aproximadamente 0.5 ml de vidrio finamente molido.
A cada tubo se le agrega:
 - a) 6.0 ml de solución salina
 - b) 0.2 ml de tromboplastina
 - c) 1.5 ml de cloruro de calcio 0.02 molar y
 - d) 0.5 ml de plasma
2. Se agita suavemente por inversión. El coágulo formado se engloba con movimientos rotatorios con el vidrio molido. Se deja reposar 15 min a 37°C y se vuelve a englobar la fibrina formada.
3. Se centrifugan los tubos y se elimina el sobrenadante dejando la fibrina en el vidrio. Debe evitarse la pérdida de fibrina.

4. Se lava tres veces la fibrina con solución salina exprimiendo el coágulo con un agitador de vidrio.
5. Se decanta perfectamente el sobrenadante.
6. A la fibrina lavada se le agrega 1 ml de NaOH al 10 % y se tapa el tubo que se coloca durante 10 min en baño maría a ebullición y con agitación -- ocasional, para que la Hidrólisis sea completa.
7. Se deja enfriar y se agregan 7 ml de agua, 3 ml de Na_2CO_3 al 20 % y 1 ml del reactivo de Folin-Cioacalteau. Se mezcla y se deja 10 min en reposo para que desarrolle color.
8. Se transfiere a una celdilla de 12 X 75 mm un ml de la solución colorida y se agregan 2 ml de agua destilada. Se mezcla y se lee contra un blanco preparado de la misma forma que las muestras a determinar a partir de la fase 6, a esta última, y se lee a 650 nm.

Solución Estándar:

La solución estándar se prepara mezclando en un tubo de 150 X 16 mm: 0.2 ml de estándar de tirosina, 1.0 ml de NaOH al 10 %, 6.8 ml de agua, 3.0 ml de carbonato de sodio al 20 %, 1 ml de reactivo de Folin-Cioacal

teau. Se deja reposar para que desarrolle color. Un ml de esta solución colorida es diluida con 2 ml de - agua y se lee contra el blanco en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 650 nm.

Se hizo por duplicado y las lecturas son promediadas.

CALCULOS:

El fibrinógeno tiene 8.547 de tirosina; por lo tanto, el factor de conversión es de: $100/8.547 = 11.7$ mg de tirosina.

Para el estándar tenemos en 0.5 ml de plasma:

$$100/0.5 = 200 \text{ mg por litro} = 0.2 \text{ mg} \times 11.7 \times 200 = 468 \text{ mg}$$

La concentración de fibrinógeno en mg por 100 ml, está dada por la fórmula:

$$\frac{\text{Absorvancia de Solución a investigar}}{\text{Absorvancia de Estándar}} \times \text{Volumen de Estándar de Tiro-sina (ml)}$$

$$\frac{100}{\text{Volumen del plasma (ml)}} \times 11.7$$

El volumen del Estándar de Tirosina es de 0.2 ml y la - concentración 0.2 mg/ml.

DETERMINACION DE FIBRINOGENO POR INMUNODIFUSION RADIAL

Fundamento:

El antígeno se deposita en un pocillo excavado en una -
capa de Agar que contiene el antisuero correspondiente.
El aumento del área del anillo de precipitación es en -
primer lugar, función del tiempo, más precisamente, de
la raíz cuadrada del tiempo. Desde el comienzo de la -
difusión del antígeno se forma un complejo antígeno-
anticuerpo. Después de suficiente tiempo de difusión,
por llegarse a la zona de equivalencia (principio gene-
ral de inmunología), se alcanza el punto final de difu-
sión. En el punto final de difusión el área del anillo
de precipitación es directamente proporcional a la con-
centración del antígeno, e inversamente proporcional a
la concentración del Anticuerpo^{6,3,10,28}

MATERIAL:

1. Solución salina
2. Placas Partigen-Fibrinógeno
3. Tubos capilares especiales para Partigen-Dispenser
4. Partigen-Dispenser
5. Regla especial para leer los halos de precipitación

6. Papel milimétrico

7. Estandar de Fibrinógeno

METODO:

El fibrinógeno Estándar se diluye con solución salina 1:2.5; 1:5 y 1:10. El problema se diluye 1:5 por medio del Partigen Dispenser y con los tubos capilares especiales se miden 2 lambdas y se llenan los pozos: la placa se mantiene a temperatura ambiente.

Los diámetros de los halos de precipitación se miden con una regla especial, la cual nos dará una lectura, esta lectura de las diluciones del Estándar nos servirán para trazar una gráfica y los puntos que se marcarán serían: para la dilución 1:2.5 26, 1:5 52 y 1:10 - 104. Esta gráfica dura más o menos 15 días después de los cuales se vuelve a recalibrar haciendo las diluciones del testigo 1:5 hasta que se termine la placa.

La lectura de los diámetros del halo de precipitación se ven en la curva de referencia; lo que nos da en mg %, los cuales se multiplican por la dilución y este resultado es la cantidad de fibrinógeno presente.

Valores de Referencia: De 200 a 400 mg %.

DETERMINACION DE FIBRINOGENO

(Método enzimático de Claus)

Fundamento:

La enzima Trombina convierte al fibrinógeno que se encuentra soluble en el plasma en su polímero insoluble, la fibrina. A altas concentraciones de Trombina (aproximadamente 100 NHI unidades/ml) y bajas concentraciones de fibrinógeno (5-80 mg/dl) la velocidad de la reacción es determinada por la concentración de fibrinógeno. Cuando se grafica en papel log-log, el tiempo de coagulación de la trombina es lineal si se compara con la concentración del fibrinógeno⁹.

REACTIVOS:

1. Trombina: Trombina bovina (aproximadamente 100 - NHI unidades /ml) con estabilizadores y amortiguadores.
2. Amortiguadores de Veronal: Barbital de sodio 2.84×10^{-2} M en cloruro de sodio 1.25×10^{-1} , pH 7.35.

EQUIPO:

1. Fibrómetro

PROCEDIMIENTO:

1. Preparación de la curva de calibración

1. Con el amortiguador de veronal se hacen las siguientes diluciones del fibrinógeno estándar 1:5, 1:15 y 1:40.

2. Mezclar suavemente. Las diluciones se hacen de la siguiente manera:

	1:5	1:15	1:40
Amortiguador	1.6 ml	0.8 ml	2.8 ml
Fibrinógeno estándar	0.4 ml	0.4 ml	0.4 ml

3. En el Fibrómetro se hacen determinaciones por duplicado de cada dilución del fibrinógeno de referencia.

- a) Incubar 0.2 ml de la dilución de fibrinógeno estándar durante 2 min (no más de 5 min) a 37°C.
- b) Adicionar 0.1 ml de reactivo de Trombina (el cual deberá estar a temperatura ambiente).
- c) Al momento de agregar el reactivo de trombina se para el cronómetro del mismo aparato, el cual al formarse el coágulo se para automáticamente.

- d) Anotar el tiempo de coagulación.
4. Graficar los tres tiempos obtenidos para cada dilución (Un promedio de los dos tiempos obtenidos de cada una de las diluciones). La unión de los tres puntos usualmente es una línea recta. La curva debe hacerse abarcando de la dilución 1:5 a la dilución 1:40 que tienen valores de un máximo de 800 mg % y un mínimo de 50 mg % respectivamente.
5. Hacer diluciones de muestras problemas y del control respectivo con amortiguador de Veronal 1:10 (0.1 ml de plasma+0.9ml de amortiguador. Todas las determinaciones se hacen por duplicado y se corren de la misma manera que las diluciones hechas para la curva de calibración. Se leen los resultados en la curva de calibración y se reporta en mg %.

Notas del Procedimiento:

1. A valores altos de fibrinógeno (más de 800 mg%). Si el tiempo obtenido es extremadamente corto, se diluye en plasma 1:20 (0.1 ml de plasma + 1.9 ml de amortiguador en lugar de 1:10. Se lee en -

la curva y se multiplica por dos que es el factor de dilución.

2. A valores bajos de fibrinógeno (menos de 50 mg %). Si se obtiene un tiempo de coagulación prolongado usando la dilución 1:10 del plasma problema, se prueba haciendo una dilución 1:5 (0.2 ml de plasma + 0.8 ml de amortiguador ó una dilución 1:2 (0.4 ml de plasma + 0.4 ml de amortiguador. El valor obtenido se lee en la curva y se divide entre el factor de dilución (Dos para la dilución 1:5, Cinco para la dilución 1:2).
3. Si con la dilución 1:2 no coagula el plasma problema; nos sugiere una concentración de fibrinógeno no abajo de 15 mg %.

Valores de Referencia para este Método de 200 a 400 mg %.

TIEMPO DE TROMBINA

Fundamento:

La trombina es una enzima derivada de protrombina, su actividad se mide por su acción sobre el fibrinógeno, es decir, mide el tiempo necesario para convertir el fibrinógeno en fibrina. Nos detecta también, la presencia o ausencia de inhibidores de la trombina³³

MATERIAL:

- a) Solución salina al 0.85 %
- b) Solución de trombina (Fibrindex), la forma comercial liofilizada reconstituida según instrucciones.
- c) Fibrómetro
- d) Pipetas 0.2 ml, terminales.

METODO:

1. En un fibrocopa se colocan: 0.2 ml de trombina y - al momento se agrega 0.1 ml de plasma, se marca el cronómetro del mismo aparato, el cual al formarse el coágulo se detiene automáticamente y se anota - el tiempo.

Valor de Referencia: 18 a 23 segundos según testigo.

DETERMINACION DE PRODUCTOS LITICOS (PLF)

(Método por Merskey y Col.)

Fundamento:

La prueba está basada en la neutralización del suero - antifibrinógeno por los productos de degradación del - fibrinógeno ó de la fibrina; este suero después no aglutina a los eritrocitos tratados con ácido tánico y conjugados con fibrinógeno ³¹.

MATERIAL:

1. Tubos de 16 X 150 mm
2. Tubos de 13 X 100 mm
3. Tubos de 12 X 75 mm
4. Pipetas de 0.2 ml y de 0.1 ml
5. Placas de titulación
6. Centrífuga

REACTIVOS:

1. Anticoagulante ACD
2. Glóbulos rojos "O"
3. Amortiguador de citrato-fosfato
4. Acido tánico 1;5000 recién preparado
5. Albúmina humana

6. Azida de sodio
7. Plasma normal (mezcla diaria de los donadores profesionales).
8. Suero testigo
9. Trombina 1000 U
10. Suero antifibrinógeno diluido 1:6000
11. Albúmina bovina al 2 % en amortiguador de citrato-fosfato.
12. Amortiguador de fosfatos pH 6.4 0.15 molar
13. Solución salina al 0.85 %
14. Citrato de sodio 0.1 molar
15. Mezcla coagulante para PLF

MATERIAL BIOLÓGICO:

- a) Plasma obtenido por punción venosa con citrato de sodio 3.8 % procurando que la sangre se agregue exactamente hasta la marca del tubo para que la proporción 1:10 se conserve rigurosamente.
- b) Sangre de tipo "O". Se colecta en solución ACD

Sensibilización de los glóbulos rojos:

El tubo de 16 X 150 mm se marca exactamente a 10 ml y se le pone 1.15 ml de anticoagulante ACD y se recolec-

tan los glóbulos rojos grupo "O" hasta la marca, se ta
pa el tubo, se agita suavemente y se mantiene en el re
frigerador durante 24 a 48 horas; el plasma que se se-
para de los glóbulos se desecha por medio de una pipe-
ta pasteur y los glóbulos se distribuyen en una serie
de tubos de 13 X 100 mm y se lavan 6 veces en 20 veces
su volumen con amortiguador salino de fosfatos. En ca
da lavada los tubos se agitan en el agitador mecánico,
para que los glóbulos rojos no se queden pegados en el
fondo del tubo. Una vez lavados, se colocan en un va-
so de precipitado de 600 ml y se llevan a 300 ml, con
amortiguador salino de fosfatos. Por otro lado, se --
prepara la solución de ácido tánico 1:5000 y se agrega
igual volumen a los glóbulos rojos, es decir, 300 ml y
se dejan una hora a temperatura ambiente. En este pa-
so los glóbulos rojos se aglutinan, si esto no sucede,
hay que comenzar de nuevo el proceso de tanización.
Transcurrida una hora, se empiezan a concentrar los 600
ml en una serie de tubos de 13 X 100 mm y una vez que
se tienen juntos, se lavan seis veces en 20 veces su -
volumen, en amortiguador de citrato fosfato. Una vez -
que se lavan se colocan en otro vaso de precipitado de

600 ml y se diluyen a 320 ml, se separan 20 ml en --
otro vaso de precipitado; por otro lado se diluye el
plasma 1:250 en amortiguador citrato fosfato y se agre
ga un volumen igual a los 300 ml de glóbulos rojos y a
los 20 ml de glóbulos rojos que se separaron en el --
otro vaso, se les agrega un volumen igual de suero tes
tigo que se prepara de la siguiente manera:

Se toma sangre sin anticoagulante de un donador normal,
se tapa el tubo y se incuba 2 horas, a 37°C, se separa
el coágulo con un aplicador de madera y se centrifuga
el tubo a 3000 rpm durante 10 minutos, se separa el --
suero a un tubo limpio y en otro tubo se coloca 0.1 ml
de trombina de 1 000 unidades, más 0.9 ml de suero, --
éste así tratado se diluye a 1:250 en amortiguador de
citrato-fosfato y se le agrega un volumen igual a los
20 ml de glóbulos rojos. Una vez que se tienen glóbu
los rojos con plasma y otros con suero, se mantienen a
37°C durante una hora, después de este tiempo, se vuel
ven a concentrar los glóbulos rojos en una serie de tu
bos y se lavan seis veces en veinte veces su volumen -
con amortiguador citrato fosfato. Una vez lavados se

diluyen los que tenían plasma en 300 ml de amortiguador citrato-fosfato y los que tenían suero en 20 ml del mismo amortiguador. En este paso, los glóbulos quedan recubiertos con proteínas del plasma y los otros con proteínas séricas.

Una vez diluidos los glóbulos rojos se les agrega 1 ml de albúmina humana por cada 100 ml y azida de sodio al 0.1 %, se agitan también y se distribuyen en tubos que se tapan perfectamente con papel parafilm y se guardan en refrigeración, teniendo cuidado de marcar perfectamente los que están sensibilizados con plasma y los que están en suero. En estas condiciones pueden durar 4 a 5 semanas. Antes de utilizarlos se lavan perfectamente con amortiguador de citrato-fosfato.

METODO:

1. En un tubo de 12 X 75 mm colocar:

0.1 ml de trombina de 10 unidades

0.45 ml de mezcla coagulante para PLF

0.45 ml de plasma problema

Se tapa el tubo con papel parafilm, se agita suavemente y se coloca en baño maría a 37°C durante dos

horas aproximadamente. Con un aplicador de madera se separa el coágulo y se trabaja con el resto -- (suero).

2. Se hace una serie de diluciones 1:100; 1:200; -- 1:400, etc. en el primer tubo (13 X 100 mm) se pone 4.95 ml de solución amortiguadora de citrato--- fosfato y 0.05 ml de suero problema o plasma, de -- plasma testigo (se preparan ambos de la misma mane ra).

En el segundo tubo (las siguientes diluciones se -- hacen en tubos de 12 X 75 mm), se pone 0.2 ml de -- amortiguador citrato-fosfato.

Del tercer tubo al décimo, se pone 0.2 ml de amor- tiguador citrato fosfato con albúmina al 2 %. Se transfiere 0.2 ml del primer tubo al segundo y así sucesivamente, hasta el décimo (cada tubo con su -- pipeta).

3. En cada orificio de las placas se pone 0.1 ml de -- las diluciones, se agrega 0.1 ml de suero antifi-- brinógeno a todos y se agita, y se incuba 30 minu- tos a 4°C., se añade una gota de glóbulos rojos --

tratados con plasma, se mezcla y se incuba a temperatura ambiente durante 15 min. Se lee la aglutinación.

4. El blanco (para el control).

Se pone 0.1 ml de solución amortiguadora de citrato-fosfato con albúmina al 2 %, se añade 0.1 ml de suero antifibrinógeno, se incuba 30 minutos a 4°C, se le añade una gota de glóbulos rojos tratados -- con suero, se incuban a temperatura y se observa -- si hay aglutinación (no debe haber).

CALCULOS:

Las lecturas se hacen en una tabla que contenga los resultados de la determinación del fibrinógeno del plasma testigo.

Al plasma testigo se le cuantifica el fibrinógeno por duplicado con un buen procedimiento, si la concentración fue de 294.7 mg %, se hace la siguiente tabla:

<u>Tubo</u>	<u>Dilución</u>	<u>Mg de Fibrinógeno</u>
1	1:100	29.47
2	1:200	14.73
3	1:400	7.36
4	1:800	3.68
5	1:1600	1.84
6	1:3200	0.92
7	1:6400	0.46
8	1:12800	0.23
9	1:25600	0.11
10	1:51200	0.05

EJEMPLO:

Si la aglutinación del problema se presenta hasta el orificio tres (dil. 1:400) y la del testigo hasta el orificio ocho (dil. 1:12800), se multiplica la dilución del problema (1:400) por la cantidad de fibrinógeno presente en la dilución del testigo (1:12800);

o sea:

$$0.23 \times 400 = 92 \text{ microgramos por ml}$$

Valores de Referencia: Menos 8 microgramos por ml.

PRUEBA DE GELIFICACION DEL ETANOL

(Godal y Abildgaard)

Fundamento:

La prueba del etanol fue primeramente descrita por Godal y Abildgaard, posteriormente modificada por Breen y Tullis. Por la capacidad que éste presenta para formar un gel con los complejos solubles constituidos principalmente por monómeros de fibrina o fragmentos X° unidos a productos de ruptura del fibrinógeno o de la fibrina^{4,5,26}.

MATERIAL:

1. Tubos de 10 X 75 mm
2. Baños de hielo
3. Etanol al 5 %

TECNICA:

1. Colocar en un tubo de 10 X 75 mm
 - a) 0.5 ml de plasma pobre en plaquetas
 - b) 0.25 ml de etanol al 5 %

El etanol se agrega cuando el plasma pobre en plaquetas se encuentra a 21°C y debe mantenerse esta temperatura durante 10 minutos.

Observar la formación de gel.

Valor de Referencia: No debe aparecer gel.

PRECIPITACION CON PROTAMINA

(Gurewich y Col.)

Fundamento:

Esta prueba de precipitación por sulfato de protamina - es específica para detectar monómeros de fibrina y productos de degradación de la fibrina^{21,24,32,37}

MATERIAL:

1. Tubos de 10 X 75 mm
2. Protamina pH = 6.5
3. Amortiguador Tris ph = 6.5

TECNICA:

Efectuar diluciones del sulfato de protamina con amortiguador Tris 1:5, 1:10, 1:20, y 1:40 colocar en tubos de 10 X 75 mm 0.2 ml de cada una de las diluciones.

Se centrifuga el plasma rico en plaquetas para obtener de esa manera plasma pobre en plaquetas. Se coloca en un tubo limpio y se incuba 5 minutos a 37°C, después de los cuales se colocan 0.2 ml de este plasma a cada uno de los tubos que contienen las diluciones de sulfato de protamina.

Se tapan los tubos y se colocan a 37°C, durante 30 min,

después se agitan suavemente para leerlos de la siguiente forma:

g = gelación

rf = red de fibrina

± = precipitado fino

+ = precipitado grueso

- = solución clara

Valor de Referencia: Solución clara

DETERMINACION POR LA PRUEBA DE FI-TEST (FT)

Fundamento:

Por acción de la trombina se consume el fibrinógeno que aún se encuentre presente en el suero, de esta manera; al agregar el reactivo de FI-Test nos dará una aglutinación la cual, será proporcional a la cantidad de productos de degradación de fibrinógeno.^{7,14,22}

MATERIAL:

1. Tubos de 12 X 75 mm
2. Aplicadores de madera
3. Solución salina
4. Trombina 1 000 U
5. Trombina 5 000 U
6. Reactivo de Fi Test

METODO:

La sangre se coloca en un tubo limpio sin anticoagulante y se tapa con papel parafilm, se coloca en baño maría a 37°C, durante dos horas, el tubo se centrifuga - 5 min a 3 000 r.p.m. y el suero se separa en un tubo - limpio.

En un tubo se coloca una gota de trombina de 1 000 U. y 9 gotas de suero. Se tapa el tubo, se agita y se coloca a 37°C durante 20 minutos. Se centrifuga el tubo 10 minutos a 3 000 r.p.m., el suero se diluye 1:2, 1:4 y 1:8 con solución salina.

Se coloca en un portaobjetos una gota de suero sin diluir, en otra, una gota del reactivo de Fi Test (antes se le pone al tubo una gota del suero diluido 1:2, -- etc.), se agita suavemente con un agitador de madera y se deja en reposo a temperatura ambiente 5 min.

Se compara con un testigo positivo. En caso de que la aglutinación permanezca hasta la dilución 1:8, se continúan las diluciones hasta que ya no exista aglutinación y, además, se repetirá la misma operación con trombina de 5 000 unidades.

Valor de Referencia: No debe aparecer aglutinación.

CAPITULO IV
RESULTADOS Y DISCUSION

Tabla 1. Controles normales

	Fibrinocrito	Placa	Claus	Parfentejev	Ratnoff
n	30	30	30	30	30
Limite, mg%	165-580	165-570	169-585	160-565	170-590
Media \bar{X} , mg%	332	334	339	325	342
Desviación Estan- dar SD, mg%	141	139	142	139	146
Coefficiente de va- riación CV %	42	41	41	42	42
Coefficiente de co- rrelación	0.99 (vs placa)	0.99 (vs Claus)	0.99 (vs Par- fentjev)	0.99 (vs Ratnoff)	0.99 (vs Fibri- nocrito)
Prueba "t" de Student	-0.031 (vs placa)	-0.85 (vs Claus)	0.226 (vs Par- fentjev)	-0.269 (vs Ratnoff)	0.160 (vs Fibri- nocrito)
p	≤ 0.05	≤ 0.05	≤ 0.05	≤ 0.05	≤ 0.05

Tabla 2. Reproducibilidad

	<u>Fibrinocrito</u>	<u>Placa</u>	<u>Claus</u>	<u>Parfentejev</u>	<u>Ratnoff</u>
n	20	20	20	20	20
Limite, mg%	291-320	270-310	351-380	250-363	360-385
Media \bar{X} , mg%	304.4	294.7	365.8	282.3	371.3
Desviación Estan- dar SD, mg%	9.02	12.35	10.03	31.05	9.51
Coefficiente de va riación CV, %	2.81	3.98	2.62	10.44	2.43
F-test	1.88 (vs Placa)	1.50 (vs Claus)	9.0 (vs Parfent jev)	10.0 (vs Ratnoff)	1.1 (vs Fibri- nocrito)

Tabla 3. Coagulación Intravascular

	<u>Fibrinocrito</u>	<u>Placa</u>	<u>Claus</u>	<u>Parfentjev</u>	<u>Ratnoff</u>
n	15	15	15	15	15
Limite, mg%	200-507	190-690	140-660	130-600	140-675
Media \bar{X}	307	311	303	286	312
Desviación Estan- dar SD, mg%	114	160	173	159	175
Coefficiente de va riación CV, %	37.2	51.5	57.3	55.6	56.1
Coefficiente de co rrelación	0.92 (vs Placa)	0.97 (vs Claus)	0.99 (vs Par- fentjev)	0.99 (vs Ratnoff)	0.96 (vs Fibro- nocrito)
T test	-0.07 (vs Placa)	0.11 (vs Claus)	0.21 (vs Par- fentjev)	-0.35 (vs Ratnoff)	0.09 (vs Fibro- nocrito)
p	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

Tabla 4. Leucemias

	<u>Fibrinocrito</u>	<u>Placa</u>	<u>Claus</u>	<u>Parfentjev</u>	<u>Ratnoff</u>
n	15	15	15	15	15
Límite, mg%	92-747	80-780	100-710	110-750	100-700
Media \bar{X} , mg%	437	420	402	391	408
Desviación Estan- dar (SD, mg%	204	195	185	189	178
Coefficiente de va- riación CV, %	46.7	46.2	46.0	48.3	43.7
Coefficiente de co- rrelación	0.94 (vs Placa)	0.90 (vs Claus)	0.98 (vs Parfent- jev)	0.98 (vs Ratnoff)	0.97 (vs Fibri- nocrito)
T test	0.18 (vs Placa)	0.20 (vs Claus)	0.12 (vs Parfent- jev)	-0.20 (vs Ratnoff)	-0.31 (vs Fibri- nocrito)
p	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

Tabla 5. Hodgkin

	<u>Fibrinocrito</u>	<u>Placa</u>	<u>Claus</u>	<u>Parfentjev</u>	<u>Ratnoff</u>
n	10	10	10	10	10
Limite, mg%	250-803	410-820	420-830	400-820	430-840
Media \bar{X}	581	611	623	601	630
Desviación Estan- dar SD, mg%	224	186	185	193	187
Coficiente de va riación CV, %	38	30	29	32	29
Coficiente de co rrelación	0.95 (vs Placa)	0.99 (vs Claus)	0.99 (vs Parfent jev)	0.99 (vs Ratnoff)	0.93 (vs Fibri- nocrito)
T test	-0.25 (vs Placa)	-0.10 (vs Claus)	0.19 (vs Parfent jev)	-0.25 (vs Ratnoff)	0.40 (vs Fibri- nocrito)
p	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

Tabla 6. Lupus Eritematoso

	<u>Fibrinocrito</u>	<u>Placa</u>	<u>Claus</u>	<u>Parfentjev</u>	<u>Ratnoff</u>
n	15	15	15	15	15
Limite, mg%	100-670	200-770	150-476	188-400	180-460
Media \bar{X} , mg %	317	334	275	272	287
Desviación Estan- dar (SD, mg%	176	181	99	69	87
Coefficiente de va- riación CV, %	55	54	36	25	30
Coefficiente de co- rrelación	0.86 (vs Placa)	0.87 (vs Claus)	0.98 (vs Parfent_ jev)	0.99 (vs Ratnoff)	0.97 (vs Fibri- nocrito)
T test	-0.19 (vs Placa)	0.85 (vs Claus)	0.07 (vs Parfent_ jev)	-0.41 (vs Ratnoff)	-0.45 (vs Fibri- nocrito)
p	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

Tabla 7. Insuficiencia Renal

	<u>Fibrinocrito</u>	<u>Placa</u>	<u>Claus</u>	<u>Parfentjev</u>	<u>Ratnoff</u>
n	15	15	15	15	15
Limite, mg%	240-710	220-890	230-720	210-700	220-750
Media \bar{X} , mg%	480	523	488	470	495
Desviación Estan- dar SD, mg%	126	196	135	135	142
Coefficiente de va- riación CV, %	26	37	27	28	28
Coefficiente de co- rrelación	0.87 (vs Placa)	0.87 (vs Claus)	0.99 (vs Parfentj- jev)	0.99 (vs Ratnoff)	0.98 (vs Fibri- nocrito)
T test	-0.55 (vs Placa)	0.43 (vs Claus)	0.29 (vs Parfent- jev)	-0.38 (vs Ratnoff)	0.23 (vs Fibri- nocrito)
p	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

Tabla 8. Cirrosis Hepática

	<u>Fibrinocrito</u>	<u>Placa</u>	<u>Claus</u>	<u>Parfentjev</u>	<u>Ratnoff</u>
n	15	15	15	15	15
Limite, mg%	100-660	56-670	47-610	50-610	49-600
Media \bar{X} , mg %	387	391	369	349	374
Desviación Estan- dar SD, mg%	191	221	193	181	198
Coefficiente de va- riación CV, %	49	56	52	51	51
Coefficiente de co- rrelación	0.95 (vs Placa)	0.96 (vs Claus)	0.96 (vs Parfent- jev)	0.95 (vs Ratnoff)	0.90 (vs Fibri- nocrito)
T test	-0.04 (vs Placa)	0.22 (vs Claus)	0.22 (vs Parfent- jev)	-0.28 (vs Ratnoff)	-0.14 (vs Fibri- nocrito)
p	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

Tabla 9, Septicemias

	<u>Fibrinocrito</u>	<u>Placa</u>	<u>Claus</u>	<u>Parfentjev</u>	<u>Ratnoff</u>
n	10	10	10	10	10
Limite, mg%	205-616	250-670	260-640	220-680	260-670
Media \bar{X} , mg%	386	406	407	377	414
Desviación Estan- dar SD, mg%	140	145	139	169	145
Coefficiente de va- riación CV, %	36	35	34	44	35
Coefficiente de co- rrelación	0.96 (vs Placa)	0.99 (vs Claus)	0.89 (vs Parfent- jev)	0.91 (vs Ratnoff)	0.94 (vs Fibri- nocrito)
T test	-0.263 (vs Placa)	-0.009 (vs Claus)	0.353 (vs Parfent- jev)	-0.431 (vs Ratnoff)	0.366 (vs Fibri- nocrito)
p	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

RESULTADOS

Comparación de los cinco métodos

Se determinó la concentración de Fibrinógeno en cada una de las muestras de plasma de los 30 sujetos "normales" (tabla 1), así como de los padecimientos ya mencionados, utilizando los métodos ya descritos.

En la tabla 1, se muestran los promedios de Fibrinógeno obtenidos por cada método; en donde podemos observar que los valores más altos los obtenemos en el método de Ratnoff y le siguen en orden descendente: el método de Claus, el método de Placa, después Fibrinócrito y por último el método Turbidimétrico.

La prueba T-Test la usamos para comparar la diferencia entre los promedios con un nivel de significancia del 5%, la cual no fue significativa como se muestra en la tabla 1, esto significa que no hay diferencia entre las determinaciones obtenidas por los diferentes métodos.

El coeficiente de correlación como se puede observar en todas las tablas presentadas (tanto de controles normales, como de padecimientos) nos sugiere una gran

aceptación puesto que hay una estrecha correlación entre los métodos analizados.

Como se observa tanto en los controles normales (tabla - 1), como en los padecimientos estudiados (tablas 3,4,5, 6,7,8 y 9) por tener datos muy heterogéneos no es posible valorar estadísticamente las desviaciones estándares obtenidas para cada caso en particular, por lo que, finalmente se hace un análisis comparativo de cada uno de los grupos estudiados.

REPRODUCIBILIDAD DE LOS CINCO METODOS

Comparando los datos obtenidos en la tabla 2, el método de Ratnoff presentó el menor coeficiente de variación - 2.43 %, seguido por el método de Claus 2.62 %, Fibrinocrito 2.8 %, Placa 3.98% y finalmente tenemos el método Turbidimétrico con 10.4 %.

Para comparar las determinaciones hechas por los diferentes métodos se utilizó la prueba F-Test para comparar entre sí la homogeneidad de los métodos analizados la cual demostró como se puede observar en el siguiente cuadro, tener una diferencia significativa, los cuales se marcan con un asterisco, en tanto que los valores no marcados significan que la variabilidad de los valores obtenidos para cada grupo son similares en cuanto a precisión de los cinco métodos.

	Placa	Claus	Parfentjev	Ratnoff
Fibrinocrito	1.88	1.25	11.85 *	1.11
Placa		1.50	6.32 *	1.69
Claus			9.48 *	1.12
Parfentjev				10.66 *

DISCUSION

De los resultados obtenidos se concluye que en una coagulopatía de consumo y síndromes fibrinolíticos es de gran importancia conocer la concentración de fibrinógeno presente en el plasma ya que de esto dependerá el adecuado tratamiento, por lo que es necesario que su determinación sea exacta y precisa, ya que se debe considerar la especificidad de la reacción para el componente de interés. Así, tenemos que el método de Ratnoff utiliza dos reacciones; primeramente, es la proteolisis del fibrinógeno por trombina y segunda la polimerización de la fibrina. En el método turbidimétrico (Parfentjev), la determinación es condicionada por el hecho de que el reactivo de sulfato de amonio produce una turbidez no específica ya que también precipitan otras proteínas por lo que el método resulta un tanto semicuantitativo. Asimismo, afectaría a la determinación la presencia de quilomicrones de plasmas lipémicos, puesto que éstos le confieren cierta turbidez al plasma. En la determinación del fibrinógeno por inmunodifusión radial en el que se observa su especificidad inmunológica, tenemos

que de los pacientes (aproximadamente un 50% con coagulación intravascular) que resultaron con productos de degradación de fibrinógeno (90 ug/ml en adelante), su difusión era más lenta que los plasmas de los pacientes que no habían tenido productos de degradación (8 ug/ml) y - que, además, los primeros al terminar de difundirse, se observaba un doble anillo de precipitación, esto se debe a que las moléculas de productos de degradación de fibrinógeno comparten determinantes antigénicas con el fibrinógeno por lo que se observa un cierto grado de competencia. La forma de una curva de calibración no lineal y - el tiempo requerido para la inmunodifusión limita seriamente su uso como técnica de rutina.

Respecto a la técnica de microprecipitación en tubo capilar para determinar fibrinógeno en la que se aprovecha - las características asimétricas y de gran tamaño de esta molécula, que precipita fácilmente al calentar el plasma a $58^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, por lo que debe mantenerse la temperatura de manera constante para evitar que se precipiten otras proteínas y tener en cuenta, el cierre de los capilares a la flama; este paso debe hacerse con cuidado para con

seguir que el fondo del capilar cerrado quede aplanado y se logre así una coincidencia lo más exacto posible, entre el fondo plano del tubo capilar y el cero de la microescala y, finalmente el llenado del capilar sea lo más exacto posible; puesto que se trabaja con volúmenes pequeños que afectan de manera importante la exactitud del método. Este último resultó ser inadecuado en los casos que se determinó concentraciones bajas de fibrinógeno, ya que, las cantidades utilizadas para este método son muy pequeñas, es difícil medir satisfactoriamente el precipitado obtenido.

Finalmente, la determinación enzimática de Claus, así como el método de Ratnoff, utilizan la reacción de la conversión de fibrinógeno a fibrina en presencia de trombina, ambos están sujetos a los efectos antagonistas de sustancias antitrombónicas. Sin embargo, como el método de Ratnoff utiliza concentraciones más altas de trombina se ve menos afectado por dichas sustancias; no así el de Claus que a dosis elevadas de heparina, es difícil determinar el fibrinógeno satisfactoriamente.

CAPITULO V
CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Como se observa en la tabla 2, el método de Ratnoff - - muestra el mejor coeficiente de variación (2.43%) y por lo que se puede apreciar en la práctica, es el más exacto y menos influenciado de los cinco métodos estudiados.

Pero como además, se ha hecho énfasis de la necesidad de un método preciso y rápido para determinar fibrinógeno en circunstancias especiales y como se puede observar en todas las tablas presentadas, los cinco métodos analizados presentan una excelente correlación, la cuestión surge - cuando se determine el fibrinógeno a un sujeto con determinado padecimiento y bajo ciertas condiciones. Se utilizará el método a seguir considerando las ventajas y -- desventajas mencionadas en este trabajo, al analizar los cinco procedimientos tenemos que destacan la sensibili-- dad y el tiempo del análisis, así se concluye que:

El método de placa requiere 48 horas para su determina-- ción. El tiempo requerido para el método nefelométrico no es más de 15 minutos. El tiempo necesario para la microprecipitación es de más o menos 20 minutos. El método enzimático de Claus requiere un tiempo total de 15 minu--

tos; y el método para determinar Fibrinógeno como pro
teína coagulable (Ratnoff) no es más de 30 minutos.
Por lo tanto, queda a criterio del analista el efec--
tuar uno u otro método, considerando lo anteriormente
expuesto y dependiendo de los recursos materiales y -
condiciones del paciente, ya que como se observa, en
cierto tipo de patología resulta más adecuado un mét
do que otro.

CAPITULO VI
BIBLIOGRAFIA.

BIBLIOGRAFIA

1. Bang, N.U , Beller F.K., Deutsch, E. et al: Trombosis and Bleeding Disorders, Theory and Methods. New York, Academic Press, 315-324, 1971.
2. Benet, B y Douglas, A. A.: Mecanismo de coagulación de la sangre. Clínica Hematológica. Vol. 1 No. 1, pág. 5, 1973.
3. Becker, W., Rapp, W., Schwick, H.G. und Storiko: Methoden zur Quantitativen Bestimmung von plasma proteinen durch immunpräzipitation. Z. Klin, Chem. Klin, Biochem., 6: 113-122, 1968.
4. Breen, F. an Tullis, J.L. Ethanol gelation: A rapid screening test for intravascular coagulation. Ann. Int. Med. 69: 1171, 1968.
5. Breen, F. an Tullis, J.L.: Ethanol gelation. Ann. Int. Med. 71: 433, 1969.
6. Brittin, G.M., Rafinia, Raval, D., Werner, M., and Brown, B.: Evaluation of single radial immunodiffusion of plasma fibrinogen. Am. J. Clin. Path. 57: 89-94, 1972
7. Bloom, A. L., and Campbell, N.: Defibrination syndrome with defective thrombin fibrinogen reaction

- reversible by protamine. Am. J. Clin. Pathol. 18:
786-789, 1965.
8. Blomack, B.: On the properties of fibrinogen and fibrin. Arkiv Kemi 12: 99-113, 1957.
 9. Claus, A.: Gerinnungs physiologische Schnell methode zur Bestimmung des fibrinogens. Acta Haemat., 17: 237, 1957.
 10. Chen, T., Lai, Ch.: Fibrinogen assay by immunodiffusion plate Am. J. Clin. Pathol. 60: 125-127, 1973.
 11. Egeberg, O.: Inherited fibrinogen abnormality causing thrombophilia. Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica, 17: 176,187, 1967.
 12. Ellis, B.C., and Strausky, A.: A guide and accurate method for determination of fibrinogen in plasma. J. Lab. Clin. Med., 58: 477, 1961.
 13. Fletcher, A.P., Alkjsersig, N., Fisher, S. and Sherry, S.: The proteolysis of fibrinogen derivatives which polymerize abnormally. J. Lab. Clin. Med. 68: 780-796, 1966.
 14. Folin, O. and Ciocalteu V.: On Tyrosine and Triptophane Determinations in proteins. J. Biol. Chem. 73: 627, 1929

15. Foster, J. B.: de Natale, A., Doti, L.: Determination of plasma fibrinogen by mean of centrifugation after heating. Am. J. Clin. Path. 31: 42, 1959.
16. Fowell, A. H.: Turbidimetric Method of Fibrinogen Assay., Am. J. Clin. Path 25: 340-342, 1955.
17. Godal, H. C., Abildgaard, U.: Gelation of soluble fibrin by ethanol. Scand. J. Haemat. 3: 342-250, 1966.
18. Grannis, G.F.: Plasma Fibrinogen: Determination, normal values physiopathologic shifts, and fluctuations. Clin. Chem., 16: 486, 1970.
19. Grant, G. H. und Butt, W. R., Immunochemical Methods in Clinical Chemistry. Advances Clin. Chem. 13: 383, 1970.
20. Gurewich, V., Lipinski, B., and Lipinska I.: A comparative study of precipitation and Pacoagulation by protamine sulfate and ethanol gelation test. Thrombosis Research. Vol. 2 pág. 539-556, 1973.
21. Instructivo para practicar la prueba rápida en lámina para investigar hipofibrinogenemia. Laboratorio Hyland, Los Angeles, California, 1962.

22. James, W. Hampton, M. D., and David Garrison, M. S.: Fibrinogen and fibrin-stabilizing factor. Medical Clinics of North America, 56: 1, 1972.
23. Knodor, W.R.: The plasma protamine Paracoagulation test: Clinical and laboratory evaluation. Am. J. Clin. Pathol. 58: 675-686, 1972.
24. Laki, K.: Enzymatic effects of thrombin. Fed. Proc. 24: 794, 1965.
25. Levine, D.: Instruction Manual of Model R-101. Microzone Electrophoresis Cell. Fullerton, California, Beckman Instruments, 1965.
26. Lorand, L., and Dickerman, R.C.: Assay method for the "Fibrin-stabilizing factor" Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 89: 45, 1955.
27. Mancini, G., Carbonara, A. O., and Heremans, J. F.: Inmonochemical Quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. Inmonochemistry pergamon Press. 2: 235-254, 1965.
28. McKay, D.G.,: Disseminated Intravascular Coagulation. Harper and Row, 335-345, 1965
29. Morse, E., Panek, S., Menga, R.: Automated fibrinogen determination Am. J. Clin. Path. 55: 671, 1971.

30. Merskey, C., Lalezary, P., and Johnson, A. J.:
A rapid, simple, sensitive method for measuring
fibrinolytic split products in human serum. Proc.
Soc. Exp. Biol. Med. 131: 871, 1969.
31. Niewarowski, S. and Gurewich, V.: Laboratory
identification of intravascular coagulation "The
serial dilution protamine sulfate test for the
detection of fibrin monomer and fibrin degradation
products. J. Lab. Clin. Med. 77: 665, 1971.
32. Okuno, T. and Selenko Vera: Plasma fibrinogen
determination by Automated Thrombin Time: Am. J.
Med. Tech. 38: 196, 1972.
33. Parfentjev, L.A., Johnson, M.L. Clifton, E.: The
determination of plasma fibrinogen by turbidity
with ammonium sulfate. Arch. Biochem. Biophys, 46:
470, 1953.
34. Ratnoff, O.D., Menzie, C.: A new method for
determination of fibrinogen in small samples of
plasma. J. Lab. Clin. Med. 37: 316-320, 1951.
35. Ruíz Reyes y Jiménez Vázquez T.: Técnica rápida de
microprecipitación en tubo capilar para determina-

- ción de fibrinógeno. Revista Mexicana de Laboratorio Clínico, 17: 204-208, 1965.
36. Russel F.: "Fibrinogen and Fibrin". Scientific American. 65: 70-80, 1981.
 37. Sanfelippo, Michael J., Stevens, David J., and Koeing Robert, R.: Protamine sulfate test form fibrin monomers. Am. J. Clin. Path. 56: 166-173, 1971.
 38. Schneider, C. L.: Defibrination syndrome. Clin. Obstet. Gynecol. 7: 339-348, 1964.
 39. Schoenheimer, R., y Sperry, W. M.: A micromethod for determination of free and combined cholesterol. J. Biol. Chem. 106: 745, 1934.
 40. Seligman, M.: Pathologie moléculaire de la coagulation. Nouv. Rev. Franc. Hemat., 10: 617, 1970.
 41. Tocantins, L. M. and Kazal, L.A.: Blood coagulation, Hemoraghe and thrombosis et al.: Thromb. Diath. Haem. 16: 321, 1966.
 42. Vermylen, C., De Vreker, R.A. and Verstraete, M.: A rapid enzymatic method for assay of fibrinogen polimerization. Clin. Chim. Acta., 1: 418, 1962.