

720403

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA



ESTUDIO COMPARATIVO DE METODOS PARA
DETERMINAR CALCIO EN SUERO

T E S I S

Que Para Obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P r e s e n t a

ROMELIA VELASCO ORTIZ

México, D. F.

1978



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 1978

NO. M.C. 432

432

FECHA _____

PROG. _____



JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

"ESTUDIO COMPARATIVO DE METODOS PARA DETERMINAR
CALCIO EN SUERO"

PRESIDENTE PROF. DEA CORONADO PERDOMO
VOCAL PROF. MA. ELENA BUSTAMANTE CALVILLO
SECRETARIO PROF. SALVADOR MARTIN SOSA
1er. SUPLENTE PROF. ESTHER GUTIERREZ GUTIERREZ
2do. SUPLENTE PROF. LEONOR FERNANDEZ SALGADO

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: HOSPITAL DEL NIÑO DIF
NOMBRE DEL SUSTENTANTE: ROMELIA VELASCO ORTIZ
ASESOR DEL TEMA: DR. SALVADOR MARTIN SOSA.

A LA MEMORIA DE MI MADRE

A MI ESOSO

Y A MIS HIJOS.

MI AGRADECIMIENTO PARA LAS PERSONAS QUE

ME AYUDARON A REALIZAR ESTE TRABAJO:

DR. SALVADOR MARTIN SOSA

Q.F.B. MA. DEL CARMEN SERNA DE GARZA

DR. JORGE VILLEGAS PATIÑO.

I N D I C E

	Pág.
I.- INTRODUCCION.....	1
II.- GENERALIDADES.....	4
III.- METABOLISMO DEL CALCIO.....	10
IV.- ALTERACIONES DEL METABOLISMO.....	24
V.- MATERIAL Y METODOS.	
A) METODO DE REFERENCIA.....	36
B) METODOS DE PRUEBA.....	43
VI.- RESULTADOS.....	50
VII.- DISCUSION.	
A) RESULTADOS.....	58
B) METODOS.....	62
VIII.- CONCLUSIONES.....	64
IX.- RESUMEN.....	67
X.- APENDICE (método de Referencia).....	69
XI.- BIBLIOGRAFIA.....	95

I - INTRODUCCION

La cuantificación de Calcio (Ca) en suero y orina es solicitada frecuentemente como una ayuda diagnóstica en diversos padecimientos. En la literatura biomédica es posible encontrar una gran cantidad de métodos basados en distintos principios, y recientemente ha sido reconocido el método de espectrofotometría de absorción atómica (EAA) como el que ofrece las mejores características de reproducibilidad y la más baja dispersión de valores, por lo cual, en el momento actual está reconocido internacionalmente "METODO DE REFERENCIA".

A pesar de todas las ventajas de este método, tiene un inconveniente relativa, que es el costo del equipo, ya que resulta inaccesible para la mayoría de los laboratorios de Química Clínica. Y aún aquéllos que cuentan con equipo de EAA, pueden verse en el caso de tener que suspender las determinaciones de Ca por falla de éste, en cuyo caso hay que recurrir a algún otro método en tanto se resuelve el problema. Por las razones expuestas, se consideró de gran utilidad tratar de definir experimentalmente y con los recursos disponibles en el laboratorio de Nefrología del Hospital del Niño DIF, cuál método alternativo podría aplicarse a la determinación de Ca con la mínima reducción de exactitud y precisión. La revisión bibliográfica de artículos científicos sobre este particular, puso de manifiesto las ventajas aparentes de algunos métodos colorimétricos y espectrofotométricos que pueden realizarse utilizando re

cursos habituales de laboratorio y aparatos sencillos para la medición del color. Algunas consideraciones de orden práctico, como la posibilidad de contar con todos los materiales necesarios con la mayor o menor complejidad de la prueba misma y el costo aproximado por determinación, hicieron posible una selección preliminar de métodos; un análisis más completo y cuidadoso de éstos, permitió llegar a una selección final, que redujo las posibilidades a los métodos evaluados en este trabajo, cuyas conclusiones constituyen una contribución al estudio y definición de alternativas metodológicas en el caso particular de la cuantificación de Ca.

Otra contribución importante de este trabajo es la comprobación de las ventajas del método de referencia para el Ca y la conveniencia de utilizarlo como base de comparación con métodos basados en otros principios.

II - GENERALIDADES

En la actualidad se cuenta con un gran número de técnicas para la determinación de calcio. Entre las cuales tenemos: (a) reacción con un anión, p. ej., oxalato, seguido por la -- cuantificación del anión; (b) quelación con el ácido etilendiaminotetracético (EDTA); (c) precipitación con ácido cloranflico o ácido naftilhidroxámico, seguido por la determinación fotométrica del anión; (d) fotometría de flama; (e) absorción -- atómica; (f) medición espectrofotométrica directa de productos de reacción colorida con varios indicadores; (g) electrodo de ión selectivo; (h) fluorescencia con rayos X; y (i) activación-- de neutrones (4).

De los métodos publicados para la cuantificación del -- precipitado de oxalato de calcio, el de titulación redox con -- permanganato de potasio o iones cesio es el más polular. En general, tres técnicas han sido empleadas en la precipitación -- del oxalato de calcio: (1) incineración previa de la muestra, -- usada principalmente para la determinación en heces, (2) precipitación de un filtrado libre de proteínas preparado con ácido tricloroacético, técnica poco satisfactoria por la cantidad de calcio que se pierde al precipitar las proteínas, y (3) precipitación directa de la muestra.

La precipitación directa de la muestra fue introducida-- en la rutina de química clínica por Kramer y Tisdall en 1921, y modificada por Clark y Collip en 1925. En ésta se practica la

precipitación del calcio directamente en la muestra con oxalato de amonio. La adición de ácido sulfúrico disuelve el precipitado de oxalato de calcio y libera ácido oxálico, que se mide posteriormente por titulación redox con permanganato de potasio; la aparición del color rosa, por exceso de permanganato, representa el final de la reacción. Este método tiene la desventaja de ser tardado, complicado, favorece la pérdida de parte del precipitado durante las lavadas a que debe ser sometido, y en la titulación puede haber error por la escasa estabilidad de las soluciones débiles de permanganato. (1)

En la actualidad existen técnicas complejométricas que utilizan EDTA como agente quelante. El EDTA forma complejos con el calcio lo mismo que con otros metales alcalinotérreos. Al quedar el calcio quelado (unido) con el EDTA, se produce en ausencia de calcio ionizado (Ca^{++}) un cambio de color de ciertos indicadores específicos, p ej., purpurato de amonio (murexida), negro eriocromo T, Cal-Red, azul de metilo timol, azul de calcofast 2G, o-cresolftaleín-complexona, etc. El pH es decisivo para evitar al máximo las reacciones con otros iones divalentes (especialmente el magnesio), también los niveles elevados de bilirrubina y la presencia de hemólisis, interfieren con la titulación directa del suero, la cual puede ser eliminada por el uso de resinas al efectuar una separación preliminar de calcio. (1) Un nuevo agente quelante el DCTA - -

(sal de Na de 1,2 diaminociclohexano N-ácido tetracético) también ha sido usado con calceína para determinar Ca en sueros hemolizados o ictericos. Elementos tales como Fe, Cu, y Zn también interfieren con los métodos de titulación directa, aunque los metales pueden formar complejos con cianida. Además, los puntos finales para muchos indicadores en las titulaciones directas con sueros son poco definidos, por lo cual se han hecho modificaciones empleando detección fotométrica de los puntos finales con purpurato de amonio y negro eriocromo T. Los valores normales utilizando el método de EDTA pueden ser ligeramente más bajos que los del método de Clark-Collip.

El método fluorométrico descrito por Diehl Ellingboe en 1956 se basa en que el calcio forma un complejo en solución alcalina que presenta una intensa fluorescencia verde amarillenta bajo luz ultravioleta de gran longitud de onda. Aquí se determina el volumen de EDTA que se necesita para quelar el calcio, destruyendo el complejo calcio-calceína; el punto final es la separación de la fluorescencia. El volumen de EDTA agregado a la solución problema se compara con el utilizado en una solución patrón de calcio, y se hacen los cálculos respectivos.

Hill en 1965 introdujo un método fluorométrico automatizado, el cual produce resultados comparables al de Clark-Collip. La calceína o fluoresceína-complexona produce fluorescencia detectable en solución alcalina en presencia de calcio pero ---

no de magnesio,

Otro método para la determinación de Ca está basado en la precipitación de éste con ácido clorántrico. (Ferro y Ham, 1957). Se precipita el calcio directamente del suero como clorantrato de calcio, disolviéndolo posteriormente con una solución de -- EDTA a un pH elevado, liberando clorantrato el cual se determina espectrofotométricamente. En sueros lipémicos la turbidez puede eliminarse por extracciones con éter.

En el método descrito por Sherrick y de la Huerga en -- 1963, la hidroxinaftalimida precipita el calcio sérico, para - su posterior disolución en EDTA y determinación espectrofotométrica del color amarillo que se produce; en su micrométodo - - - (0.05 ml de suero) se añade una solución de nitrato férrico a la solución de EDTA del precipitado disuelto, para producir un complejo férrico a través de una reacción hierro-hidroxamina, - que produce un color ámbar más intenso.

Los métodos químicos simples para la determinación de Ca, están basados en la fotometría de una reacción colorida, pro-- ducto de la reacción del calcio con un reactante. Estos méto-- dos se tratarán en el capítulo de material y métodos con mayor detalle.

El análisis de activación de neutrones ha sido usado para la determinación de Ca en suero y otros especímenes biológicos. El Ca puede ser medida como ^{49}Ca (vida media= 8.8 min). -

La detección límite para calcio fue de 3 microgramos, equivalente a 0.03 microlitros de suero. Sin embargo el método requiere una preparación química elaborada, una instrumentación muy sofisticada y operaciones complicadas de computadora empleando muchos factores de corrección.

El método del electrodo de Ca-ión selectivo, mide la actividad del ión calcio en suero en presencia de otros iones comunes. El electrodo utiliza un ión líquido cambiador de membrana que contiene la sal de calcio de un ácido fosfórico disustituido (ácido didecilsfosfórico de calcio 0.1 M) disuelto en fosfato di-n-octilfenil. El electrodo de referencia contiene --- CaCl_2 0.1 M y un electrodo de Ag-AgCl. el ión lipofílico cambiador de molécula (ácido didecilsfosfórico de calcio) funciona como mecanismo de transporte para Ca^{++} . Los valores de Ca^{++} , se determina con una curva estándar en la cual se grafican milivoltios contra log de la concentración de Ca^{++} . La respuesta del electrodo se mejora estandarizándolo con suero antes que con soluciones acuosas. (4)

III - METABOLISMO DEL CALCIO

Papel fisiológico del calcio.- Los huesos y dientes contienen más del 99% del calcio total. Los iones calcio (Ca^{++}) -- son esenciales para la formación, conservación y reparación del hueso, para la activación de diversas enzimas, incluyendo las que intervienen en la coagulación de la sangre, para la contracción muscular y la transmisión de los impulsos nerviosos. Es -- más, los iones calcio, disminuyen la permeabilidad de las membranas celulares y de los capilares y deprimen la excitabilidad neuromuscular.

En vista de que la mayor proporción del calcio del organismo se encuentra depositado en el hueso, es necesario hacer -- un estudio de la composición y del papel que tiene el sistema -- esquelético en el metabolismo del calcio. El hueso se compone -- de una matriz orgánica resistente, considerablemente reforzada -- por depósitos de sales de calcio. El hueso compacto tiene un -- promedio alrededor de 25 por 100 de matriz y 75 por 100 de sales en peso; el hueso de nueva formación puede tener un porcentaje de matriz mucho mayor. La matriz orgánica del hueso se com -- pone de aproximadamente 95 por 100 de fibras de colágena; el 5 -- por 100 restante corresponde a un medio homogéneo llamado sustancia fundamental, la cual está formada por líquido extracelular, mucoproteína, sulfato de condroitina y ácido hialurónico. -- El papel exacto de éstos se desconoce, aunque quizá contribuyan a suministrar un medio donde se depositen las sales de calcio. --

Las sales cristalinas que se depositan en la matriz orgánica del hueso se componen sobre todo de calcio y fosfato; - la sal más importante es la hidroxiapatita ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{Ca}(\text{OH})_2$) (3). También existen entre las sales del hueso iones de magnesio, sodio, potasio y carbonato; sin embargo, los estudios de difracción de rayos X, no permiten individualizar sus cristales. Por lo tanto, parece que se encuentran adsorbidos en la superficie de los cristales de hidroxiapatita, en lugar de estar organizados en cristales propios y distintos.

Existen concentraciones de iones calcio y fosfato en los líquidos extracelulares considerablemente mayores que las necesarias para la precipitación de hidroxiapatita. Sin embargo, como se necesitan muchos iones de calcio para formar una sola molécula de hidroxiapatita, es muy difícil que todos estos iones coincidan simultáneamente en el mismo lugar; por lo tanto, la precipitación es un fenómeno muy lento normalmente y de no intervenir algún fenómeno activo, se necesitarían meses o años para alcanzar cantidades medibles. Además existen en muchos tejidos del organismo, y en el plasma, inhibidores que evitan esta precipitación; uno de ellos es el pirofosfato. Por lo tanto, no hay precipitación de cristales de hidroxiapatita en los tejidos normales a pesar del estado de sobresaturación de las soluciones iónicas.

Como primera etapa en la producción de hueso tenemos la

secreción por los osteoblastos de sustancia de base y de colágena. La colágena se polimeriza rápidamente formando fibras, y el tejido resultante se transforma en cartílago. Al poco tiempo, empiezan a precipitarse en el cartílago cristales de hidroxapatita (se piensa que las fibras de colágena del cartílago están preparadas especialmente, de antemano, para producir precipitación de cristales de hidroxapatita), resorbiéndose gran parte de la sustancia de base. Los cristales aparecen primero en la sustancia misma de las fibras de colágena, formándose luego cristales alrededor de dichas fibras, hasta que queda muy poco espacio para la sustancia de base. De esta manera, el producto final está formado principalmente por fibras de colágena y cristales de hidroxapatita, o sea hueso.

Ocurre formación continua de hueso por acción de los osteoblastos, y resorción continua en los sitios donde predomina la actividad de los osteoclastos. La actividad de resorción ósea de los osteoclastos depende de la hormona paratiroidea (HP), así como la transformación de los osteoblastos y osteocitos del hueso en osteoclastos.

Histológicamente, la resorción del hueso tiene lugar en la vecindad inmediata de los osteoclastos. Estudios recientes con microscopio electrónico han demostrado la presencia de pequeños cristales óseos en el interior de los osteoclastos, indicando que éstos a veces fagocitan y digieren partículas óseas,

para finalmente mandar a los líquidos extracelulares calcio, -- fosfato y productos finales de la digestión de la matriz orgánica. Sin embargo, este proceso fagocítico no es el único medio de resorción de hueso, ni siquiera el más importante; se piensa que la mayor parte de dicho fenómeno se debe a la secreción por los osteoclastos de fermentos o ácidos que digieren o disuelven la matriz ósea y simultáneamente ocasionan disolución de las sales del hueso. La resorción del hueso es la acción más importante del organismo para restaurar las concentraciones del calcio en los líquidos extracelulares (suero) a sus límites normales; aunque tal vez necesite horas para empezar, su capacidad es casi infinita.

Función del calcio en la coagulación de la sangre.- En ausencia de iones de calcio no trabaja ni el sistema extrínseco, ni el sistema intrínseco. Sin embargo, en la sangre normal casi siempre hay iones de calcio en exceso para que la cinética de las reacciones de coagulación, no sea modificada por la falta de iones calcio. El calcio en realidad no interviene en ninguna de las reacciones, sino que actúa como cofactor para que éstas ocurran.

Efecto de los iones calcio sobre el corazón.- Un exceso de iones calcio hace que el corazón entre en contracción espástica. Esto depende de una acción de los iones de calcio excitando el proceso contráctil cardíaco. Inversamente, una deficien--

cia de iones de calcio provoca corazón flácido, similar al -- efecto de la hipercalemia.

Sin embargo, es dudoso que la concentración de iones -- llegue a cambiar lo suficiente durante la vida para alterar en forma notable la función del corazón, pues una disminución con siderable matará a una persona por tetania, antes de poder - - afectar netamente al corazón; al aumentar la concentración de iones de calcio precipitarán en los tejidos corporales como sa-- les cálcicas insolubles antes de poder alcanzar tal nivel.

Iones calcio e iniciación de la contracción muscular.-- La presencia de concentraciones muy bajas de iones de calcio - en las miofibrillas, del orden de 2×10^{-4} molar, producirá -- una contracción muscular máxima, pero la concentración normal de iones de calcio sólo es de 10^{-7} molar, demasiado pequeña pa ra desencadenar las contracciones. De todas maneras, el flujo de corriente eléctrica a través de las paredes de los túbulo-- longitudinales hace que liberen iones de calcio hacia el proto plasma vecino. En unas cuantas diezmilésimas de segundo estos iones difunden hacia el interior de las miofibrillas, y ahí -- inician el proceso de contracción. Se cree que este es el mecan ismo por virtud del cual el potencial de acción origina con-- tracción muscular.

Sin embargo, los iones de calcio no persisten en la mio fibrilla por más de unas pocas milésimas de segundo; una vez -

que la corriente termina, los túbulos longitudinales casi inmediatamente resorben los iones de calcio sacándoles del protoplasma. En consecuencia, el potencial de acción en realidad -- provoca una pequeña pulsación de iones de calcio en la miofibrilla y es durante este tiempo que se activa el proceso de -- contracción. Al terminar esta pulsación de iones calcio, el -- músculo inmediatamente se relaja.

Papel del calcio en la permeabilidad celular.- Un exceso de iones de calcio en el líquido extracelular disminuye la permeabilidad de la membrana del nervio para el sodio. Los iones de calcio también tienen un elevado poder de fijación de proteína. Por lo tanto, se cree que, en condiciones normales, los "conductos" de sodio están revestidos por iones de calcio unidos a sus paredes. A consecuencia de sus cargas positivas, los iones de calcio repelen los de sodio y otros iones positivos, y dificultan su paso a través de los conductos. Sin embargo, sí algunos iones de calcio pueden ser desalojados de los lugares donde estaban fijados. En consecuencia, penetran todavía más iones de sodio. El proceso se va acelerando hasta que no quedan más iones de calcio para bloquear el paso de sodio a través de los conductos. A medida que van penetrando más iones de sodio al interior de la membrana llevan consigo cargas positivas haciendo que se produzcan la inversión de potencial con positividad dentro de la membrana y negatividad por fuera.

La positividad dentro de la membrana ahora dificulta la penetración de más iones de sodio. Esto, evidentemente, interrumpe el paso de los iones sodio, y permite que los iones de calcio empiecen a fijarse nuevamente en los lugares de acoplamiento de los poros de la membrana. Se inicia así otro círculo vicioso que opera en dirección opuesta: cuando los iones de calcio se fijan, la conductancia de sodio disminuye, lo cual permite que se fijen más iones de calcio todavía disminuyendo la conductancia del sodio más y más. Este ciclo continúa hasta que la membrana se ha vuelto de nuevo casi totalmente impermeable al sodio. (hay que tomar en cuenta que hasta hoy esto es sólo una teoría) (1).

Distribución del calcio en el organismo. - Como ya dijimos anteriormente, más del 99% del calcio total se encuentra en los huesos y dientes. El plasma contiene unos 5 meq/l (10mg/100ml) de calcio y se acepta como normal una variación de 4.5 a 5.5 meq/l. Lo estrecho de la zona de normalidad indica que el control del nivel plasmático de calcio es muy exacto.

En el plasma el calcio se encuentra en tres formas diferentes: 1) Aproximadamente la mitad está combinada con las proteínas del plasma, sobre todo la albúmina y por lo tanto no puede difundir a través de las membranas capilares. 2) Cerca del 5 por 100 se encuentra en forma de complejos, por combinación con citrato, bicarbonato y fosfato, estando entonces en -

forma difusible pero no ionizada. 3) El 45 por 100 restante del calcio plasmático está ionizado y puede difundir a través de -- las membranas capilares. Por lo tanto en condiciones normales - el plasma y los líquidos intersticiales tienen una concentra--- ción de iones calcio cercana a 2.3 meq/l. Esta fracción ioniza- da tiene importancia para la mayor parte de las funciones - del calcio en el organismo, en particular para sus efec--- tos sobre el corazón y sistema nervioso y para la forma--- ción de tejido óseo. La concentración de calcio en el líqui- do extracelular es del orden de 65 a 70 por 100 de la que se encuentra en el plasma.

Necesidades del calcio.- El adulto necesita de 0.5 a 2.0 g/día. durante la infancia, embarazo y lactancia, las necesida- des dietéticas deben ser aumentadas de un 25 a 75% para mante-- ner un balance cálcico adecuado; Esto es esencial para las nece- sidades metabólicas; especialmente durante las fases de creci-- miento y desarrollo óseo.

Absorción.- La leche y sus derivados son las principales fuentes del calcio de la dieta. El calcio de los alimentos es - absorbido por un fenómeno activo a nivel de intestino delgado - alto. Intervienen muchos factores en la absorción variable del- ción calcio (Ca^{++}), y entre los que la promueven tenemos:

- 1) La vitamina D, que tiene una función bien comprobada-

en su capacidad de aumentar la absorción digestiva del calcio. Este efecto se debe a una acción directa de la vitamina "D" -- sobre las células epiteliales de la mucosa del duodeno y del -- yeyuno, aumentando el transporte activo del calcio por la mu-- cosa intestinal. Aunque se desconoce el mecanismo de este ma-- yor transporte activo, podría deberse a que la vitamina "D" au-- mente la cantidad de una proteína fijadora de calcio en dichas células epiteliales (1).

El grupo de vitaminas "D" está formado por varios com-- puestos de tipo esterol. Las dos vitaminas "D" más conocidas -- son la "D₂" y la "D₃" (respectivamente, calciferol y 7-dihidro colesterol activado). La vitamina "D₃" se forma en la piel por irradiación con rayos ultravioleta de la luz solar.

2) La hormona paratiroidea (HP), una de cuyas funciones es el control de la absorción de calcio, de acuerdo a la concentra-- ción del ión calcio en los líquidos extracelulares. Aún cuando se -- disponga de bastante vitamina "D", es posible que la absorción in-- testinal de iones Ca^{++} sea parcial ya que esa absorción está regula da en gran parte por la concentración del ión calcio en los líquidos extracelulares. Una disminución muy pequeña (una fracción de mili-equivalente) de dicha concentración aumenta varias veces la absor-- ción del calcio en el intestino; recíprocamente, una elevación del mismo orden significa disminución importante de la absorción. Los factores que originan esta dependencia de la absorción cálcica de -- la concentración que tengan los iones en líquido extracelular no-

se conocen bien, pero por lo menos uno de ellos es la hormona paratiroidea, que tiene acción directa sobre la mucosa digestiva para aumentar la absorción del calcio. La disminución de iones de calcio en el líquido extracelular provoca intensa secreción de HP. Por lo tanto, actúa un mecanismo de retroalimentación por el cual la disminución de la concentración de calcio aumenta la absorción de calcio por el intestino.

3) Entre más alcalino sea el contenido intestinal, menor solubilidad tendrán las sales de calcio. Un aumento en la flora acidófila del intestino (por ejemplo, con la administración de lactobacilos) se recomienda para disminuir el pH, lo cual favorece la absorción de calcio.

Entre los factores que disminuyen la absorción intestinal tenemos:

1) Una proporción de Ca:P en la dieta superior a 2:1, por que se formará bastante $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y disminuirá la absorción.

2) Cuando hay alteración en la absorción de las grasas, existen bastantes ácidos grasos libres (p. ej. en la esteato- - rrea). Estos ácidos reaccionan con el calcio libre para formar jabones insolubles de calcio., que se pierden con las heces.

Excreción.- Se eliminan por las heces aproximadamente -- siete octavos del calcio ingerido diariamente y el resto se - - pierde por la orina. En realidad, la excreción fecal de calcio-

es el resultado del equilibrio entre la absorción intestinal -- del mismo y la secreción de calcio en el intestino. Por ejemplo, la ingestión diaria de un adulto promedio es alrededor de 750mg. de calcio. Si aceptamos que se absorbe la totalidad, y que la secreción de calcio con los jugos digestivos es de unos 625 mg. hay una absorción neta de tan sólo 125 mg., que es la cifra - - usual.

Cuando la concentración del ión calcio en los líquidos - extracelulares es baja, también disminuye mucho la eliminación - por la orina. Uno de los factores que participan en el control - de esta eliminación de iones calcio es la HP; el aumento de secreción de dicha hormona aumenta la resorción tubular de calcio, mientras que al bajar la producción de hormona la cantidad de - calcio que pasa a la orina es mayor.

Cada día se filtran por los glomérulos renales, para con centraciones plasmáticas normales, cerca de 1000 mg. de calcio, pero se resorben de 80 a 95 por 100 de este total, de manera -- que sólo se excretan con la orina de 50 a 200 mg. En el adulto - normal, la suma de las cantidades excretadas por heces y orina - es igual a la cantidad ingerida con los alimentos. En el niño en crecimiento y en la mujer embarazada, la ingestión de calcio -- con los alimentos es superior a las excreciones fecal y urinaria combinadas, o sea que existe un equilibrio positivo de calcio. - Cuando la concentración plasmática de calcio es inferior a - - -

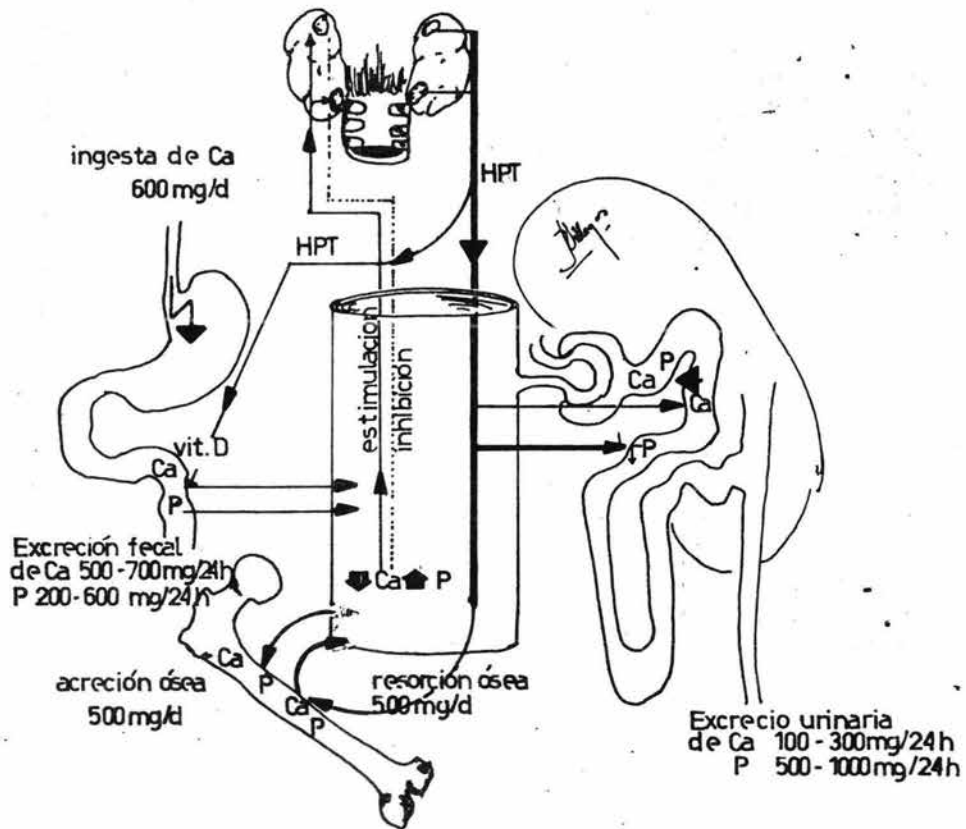
7 mg/100 ml., todo el calcio filtrado por los glomérulos es re sorbido en los túbulos, y no hay calcio en la orina.

Resumiendo las funciones de la HP sobre el metabolismo del calcio, tenemos que actúa: 1) sobre la mucosa del intesti no alto (en presencia de una cantidad suficiente de vitamina - "D"), aumentando la absorción del calcio de los alimentos, 2) sobre el túbulo proximal del riñón aumentando la resorción del calcio desde el filtrado glomerular, 3) sobre los osteoblastos, transformándolos en osteoclastos y aumentando la actividad de estos últimos. La principal acción de la HP sobre el hueso y las células del túbulo renal se debe probablemente a formación de monofosfato cíclico de 3', 5' - adenosina (AMP cíclico) en las membranas celulares (2).

Otra hormona que interviene en el metabolismo del calcio es la calcitonina, la cual disminuye la concentración sanguínea del ión calcio y estimula la entrada del Ca en los huesos. La liberación de calcitonina es estimulada por niveles altos -- del ión calcio en suero. La calcitonina es efectiva directamen te sobre el hueso, donde da por resultado efectos metabólicos opuestos a los de la HP, aunque sin actuar sobre los mismos me canismos, ya que actúa sobre los niveles de calcio circulante -- más rápido que la HP, pero, en general, los efectos son cuanti tativamente menores, así como de menor duración. La calcitoni -- na alcanza su actividad máxima en menos de una hora; en cam --

bio, el efecto máximo de la HP, requiere unas ocho horas y persisten por 24 a 36 horas. Por lo tanto, el mecanismo de la calcitonina podría desempeñar una función importantísima para evitar excesos o carencias agudas del ión calcio en los líquidos corporales (5). Además, la calcitonina influye sobre el transporte de iones en el riñón.

En la Fig. "A" representamos esquemáticamente el metabolismo del calcio.



Metabolismo de Calcio

Fig. "A"

IV.- ALTERACIONES DEL METABOLISMO DE CALCIO.

Existen distintas enfermedades que pueden causar alteraciones del metabolismo del calcio, y en las que las determinaciones de calcio sérico y urinario son utilizadas como fuente inicial de datos, a pesar del enmascaramiento que puede existir por la duración o severidad de las lesiones únicas o múltiples.

Howard y Thomas (7) clasificaron las alteraciones del metabolismo del calcio de la siguiente manera:

PERDIDA DE CALCIO CON NORMOCALCEMIA:

Deficiencia de Vitamina "D"

-Raquitismo

-Osteomalcia (en los adultos, otros factores aparte de la vitamina "D").

Síndrome de mala absorción (esteatorrea)

Osteoporosis

-Senil o posmenopáusica

-Agnesia ovárica

-Falta de utilización

-Deficiencia nutricional (proteínas y calorías)

-Hipertiroidismo

-Síndrome de Cushing

-Acidosis metabólica crónica

PERDIDA DE CALCIO CON HIPERCALCEMIA:

Hiperparatiroidismo

-Adenoma, 90%, generalmente solitario pero múltiple en el 10%.

-Hiperplasia, de células claras y de células principales, 90%.

-Carcinoma, 1%.

Intoxicación por vitamina "D"

Neoplasias

-Tumores metastásicos u osteolíticos

-Carcinoma de mama

-Mieloma múltiple

-Linfomas y leucemia

Neoplasias varias sin evidencia directa de afectación ósea.

-(?) Tumores secretores de paratormona, con carcinoma de pulmón, pecho, riñón, vejiga, páncreas, esófago y otros órganos.

-Sarcoidosis (30 al 60% de los pacientes)

-Síndrome de leche-alcalinos

Varias

-Hipercalemia idiopática de la infancia.

-Atrofia por falta de utilización por inmovilización de una parte importante del organismo.

-Hipertiroidismo.

-Enfermedad de Addison.

HIPOCALCEMIA:

Hipoparatiroidismo

- Extirpación involuntaria de las glándulas paratiroides o su lesión durante la tiroidectomía.
- Idiopático, con infecciones sistémicas o sin ellas, como candidiasis.
- (?) Enfermedad autoinmune, cuando se asocia con la enfermedad de Addison, o con la tiroiditis de Hashimoto.
- Pseudohipoparatiroidismo (defecto de órgano terminal).
- Deficiencia acentuada y sostenida de vitamina "D".

= Raquitismo

= Osteomalacia

Insuficiencia renal

- Aguda (anuria)
- Crónica

Acidosis tubular renal o síndrome de Fanconi

Pancreatitis aguda

Insuficiencia pituitaria

(?) Exceso de tirocalcitonina

Fisiología de las enfermedades óseas de origen paratiroides.- Como se mencionó en el capítulo anterior, la función primaria de la HP es la de mantener la concentración de calcio ió-

nico en el plasma dentro de los estrechos límites de estré elec trolito, cuando por algún motivo esta función se ve alterada, - se pueden presentar cualquiera de los siguientes estados patoló gicos:

1.- HIPOPARATIROIDISMO.- Cuando la glándula paratiroides no produce bastante hormona, los osteoclastos del hueso se tor- nan inactivos. El resultado es que la resorción ósea disminuye- tanto que el nivel de calcio en los líquidos corporales baja.

En la extirpación quirúrgica de las glándulas paratiroi- des, la cifra de calcio sérico puede disminuir por debajo de -- 3.5 meq/l. Al alcanzar este nivel, aparecen los signos usuales- de tetania.

Tetania por hipocalcemia. En la tetania el sistema ner- vioso se vuelve progresivamente más excitable, tal vez por au- mento de permeabilidad de las membranas. Este aumento de excita bilidad tiene lugar tanto en el sistema nervioso central, como- en los nervios periféricos, aunque la mayor parte de síntomas - dependen de alteraciones de éstos últimos. Las fibras nerviosas se vuelven tan excitables que inician impulsos nerviosos; éstos llegan a los músculos esqueléticos periféricos y provocan con- tracción tetánica. Uno de los grupos musculares que tiene mayor sensibilidad frente al espasmo tetánico es el de los músculos - de la laringe; su espasmo impide la respiración y ello es causa de muerte en la tetania cuando no se trata.

2.- HIPERPARATIROIDISMO.- En el hiperparatiroidismo asociado con lesiones patológicas, la ayuda más importante para el diagnóstico, lo constituye el hallazgo de hipercalcemia superior a 5.3meq/l; una elevación de la fracción ionizada de calcio es un hallazgo constante, excepto en presencia de insuficiencia renal avanzada (3). La exactitud y precisión en la determinación de la calcemia es de gran importancia para la detección de esta enfermedad en pacientes que incluso pueden estar asintomáticos o quejarse de molestias inespecíficas tales como: náuseas, vómitos, anorexia, estreñimiento, pérdida de peso y cambios sensoriales que acaso progresen al coma. La nefrolitiasis o, menos frecuente, la nefrocalcinosis y la pancreatitis aguda pueden ser las primeras manifestaciones, mientras que la osteítis fibrosa quística generalizada se presenta en los casos de afectación aguda y prolongada y también refleja una ingesta o absorción inadecuada de calcio. Una superproducción fisiopatológica de hormona paratiroidea acentúa la resorción ósea, que a su vez ocasiona hipercalcemia o hipercalciuria, así como una disminución en la resorción tubular renal de fósforo y a la larga hipofosfatemia. Si la enfermedad ha evolucionado al estado de insuficiencia renal, quizá no existan los hallazgos clásicos de calcio sérico elevado y fósforo disminuido, puesto que la insuficiencia renal causa una retención del fósforo y una disminución en el calcio sérico; a su vez, esto estimula la secreción-

de la hormona paratiroidea. Por ello puede ser difícil y algunas veces casi imposible, el diagnóstico diferencial entre hiperparatiroidismo primario, con insuficiencia renal y el hiperparatiroidismo secundario por insuficiencia renal crónica.

El hiperparatiroidismo secundario, asociado más frecuentemente con insuficiencia renal crónica progresiva, se suele atribuir a la retención de fósforo. Los hallazgos bioquímicos fundamentales son un fósforo sérico elevado y un calcio sérico bajo. Los niveles de hormona paratiroidea son superiores a los normales tanto en el hiperparatiroidismo primario, como en el secundario, pero la presencia de insuficiencia mitiga el efecto fosfaturico de la hormona, de manera análoga a la insuficiencia del órgano efector (túbulo renal).

En un estudio hecho con un grupo de personas hipertiroideas, se midieron los niveles de calcio ionizado y total, así como las concentraciones de la hormona paratiroidea. Los niveles de calcio ionizado fueron elevados en 21 pacientes de 45 estudiados (47%), el calcio total fue elevado en 12 de 45 (27%). Los niveles medios de calcio ionizado y total fueron más altos en estos 45 pacientes que en personas normales. Usando dos sistemas diferentes de radioinmunoensayo para un total de 44 determinaciones se encontró que los niveles medios de la hormona paratiroidea fueron más bajos en pacientes tirotóxicos que en sujetos hiperparatiroides. Estos datos nos indican que: 1) las concen--

traciones de calcio ionizado y total se encuentran frecuentemente elevadas en pacientes tirotóxicos, 2) las concentraciones de calcio ionizado pueden ser elevadas en mayor porcentaje que las del calcio total en sujetos hipertiroideos y 3) la hipercalcemia asociada con tirotoxicosis no se asocia con niveles altos de la hormona paratiroidea. (8)

La hipercalcemia también se presenta en otras enfermedades, incluyendo la intoxicación por vitamina "D", la ingesta -- prolongada o excesiva de calcio y alcalinos o síndrome de leche --alcalinos.

3.- RAQUITISMO .- Este suele ocurrir en niños a consecuencia de falta de calcio o de fosfato en los líquidos corporales. De ordinario, la enfermedad obedece a falta de vitamina -- "D", más bien a que a falta de calcio o fosfato, en la alimentación. Si el niño recibe bastante luz solar, el 7-dihidrocolesterol de la piel se activa por acción de los rayos ultravioleta, formando vitamina "D₃" que evita el raquitismo al aumentar la absorción intestinal de calcio y fosfato.

El raquitismo afecta a lactantes y niños menores de 18 meses; y, generalmente se manifiesta al final del invierno. Esto se explica de la siguiente manera: 1) en estas edades, las necesidades de vitaminas son mayores, por el rápido crecimiento 2) la alimentación natural de estos niños suele ser pobre en vitamina "D" y 3) falta la luz solar.

Los cambios bioquímicos en el raquitismo son muy variables y depende de la alimentación, la etapa de la enfermedad, y el grado de hiperplasia paratiroidea secundaria. Se presenta hipersecreción homeostática de hormona paratiroidea en cuanto tiende a bajar el calcio del suero. Así se conserva una calcemia vecina de la normal, pero disminuye mucho el fosfato inorgánico del suero, por fosfaturia.

En el raquitismo existe una falta pronunciada la calcificación ósea, lo que ocasiona un retraso de crecimiento y deformidades más ostensibles debidas a alteraciones de las áreas de crecimiento epifisiario.

Osteomalacia.- La osteomalacia es para los adultos lo que el raquitismo para los niños; se llama frecuentemente "raquitismo de adulto". En contraste a los niños con raquitismo debido a deficiencia en vitamina "D", cuando las demandas del crecimiento óseo son máximas, la osteomalacia en los adultos casi nunca se asocia con deficiencia en vitamina "D", y los factores que la causan no se conocen muy bien. Se han considerado como responsables en diferentes grados, las anormalidades en la matriz del hueso que impiden la mineralización normal y también una concentración insuficiente de calcio y fósforo en líquidos extracelulares; ambos defectos pueden ser responsables (3).

Bioquímicamente, los fenómenos son semejantes en la osteomalacia y el raquitismo: al ir bajando el calcio sérico, au-

menta la secreción de hormona paratiroidea, se libera calcio de los huesos y aumenta la excreción de fosfato.

4.- OSTEOPOROSIS.- La osteoporosis es una enfermedad distinta de la osteomalacia y del raquitismo, pues depende de la formación anómala de matriz orgánica, en lugar de trastornos de la calcificación del hueso. En general, la osteoporosis se acompaña de actividad osteoblástica disminuída, con lo que disminuye paralelamente la formación de hueso. Las causas de la osteoporosis son: 1) falta de utilización de los huesos; 2) desnutrición tan importante que no pueda formarse matriz proteíca; 3) - falta de vitamina "C"; 4) falta posmenopáusica de estrógenos;-- 5) edad avanzada, en las que muchas funciones de anabolía proteínica disminuyen; 6) enfermedad de Cushing; 7) Acromagalia.

En la tabla designada con la lebra "B" se presenta un resumen de los hallazgos bioquímicos en las enfermedades óseas y de las glándulas paratiroides.

RESUMEN DE LOS HALLAZGOS BIOQUIMICOS EN LAS ENFERMEDADES OSEAS
Y DE LA GLANDULA PARATIROIDES. (3)

FIG. "B"

ENFERMEDAD	SUERO		ORINA		FOSFATASA SERICA ALCALINA
	Ca	HPO ₄	Ca	HPO ₄	
Hiperparatiroidismo primario	↑	↓	↑	↑	N ó ↑
Hiperparatiroidismo secundario.	↓	↑	↑ ó N	↓ ó N	N ó ↑
Hipoparatiroidismo	↓	↑	↓	↓	N
Seudohipoparatiroidismo	↓	↑	↓	↓	N
Raquitismo u osteomalacia del adulto (grave)	↓	↓	↓	↓	↑
Raquitismo resistente a la vitamina "D" (hipofosfatemia familiar)	N ó ↓	↓	N	↑	↑
Acidosis tubular renal o sín- drome de Fanconi	N ó ↓	↓	↑	↑	↑
Intoxicación por vitamina -- "D"	↑	N ↑ ↓	↑	↑	N
Enfermedad de Paget (osteí- tis-formante)	N ó ↓	N	N ó ↑	N	↑ ↑
Displasia fibrosa del hueso.	N	N	N	N	↑

V.- MATERIAL Y METODOS.

MATERIAL BIOLÓGICO.

Se trabajaron alrededor de 120 sueros de pacientes del Hospital del Niño DIF. Estas muestras se tomaron en ayunas y se procesaron el mismo día. No se utilizaron sueros lipérmicos ni hemolizados.

MÉTODOS:

A) 1.- ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATOMICA (MÉTODO DE REFERENCIA).

PRINCIPIO.

Los átomos de calcio que se encuentran presentes en la flama absorben la energía de la lámpara de cátodo hueco de calcio a una longitud de onda de 422.7 nm. Esta absorción es directamente proporcional al número de átomos de calcio presentes en la flama.

REACTIVOS.

a) Solución blanco madre (140 mmol/l de NaCl y 5.0 mmol/l de KCl). En un matraz volumétrico de un litro adicionar 8.18g de NaCl y 373 mg de KCl. Disolver con agua deionizada y aforar.

b) Solución diluyente (10 mmol/l de LaCl_3 y 50 mmol/l de HCl). Pesar 1.63 g de La_2O_3 y disolverlos en 10 ml de agua deionizada, agregar 6.7 de HCl conc, agitar suavemente y llevar a un litro con agua deionizada.

c) Patrones primarios de calcio. Preparar un mínimo de--

tres concentraciones de calcio; 2.00, 2.50 y 3.00 mmol/l. Cada solución debe contener 140 mmol/l de NaCl y 5.0 mmol/l de KCl. Para la preparación de estos estándares se utilizó CaCO₃ SMR -- 915, el cual se secó a 200°C durante 4 horas y se puso a temperatura ambiente en un desecador antes de utilizarse.

Colocar en cada uno de los matraces de un litro 8.18 g-- de NaCl y 373 mg de KCl. Al primer matraz (2.00 mmol/l de Ca) - Agregar 200.2 mg de CaCO₃; al segundo (2.50 mmol/l de Ca) 250.2 mg de CaCO₃; y al tercero (3.00 mmol/l de Ca) 300.3 mg de CaCO₃. Poner en cada uno de los matraces de 10 a 20 ml de agua deionizada más 1 ml de HCl conc. Asegurarse de que se haya disuelto todo el CaCO₃ antes de aforar.

TECNICA.

Diluir todas las soluciones (sueros, estándares, sol, -- blanco) de 10 a 20 veces con la solución diluyente (b). Se recomienda utilizar la misma pipeta, para la preparación de las diluciones, con el objeto de evitar al máximo los errores causados por las diferencias volumétricas entre éstas.

Con la solución blanco de trabajo (esta se prepara diluyendo la sol. blanco madre (a)), llevar a cero el aparato.

MATERIALES

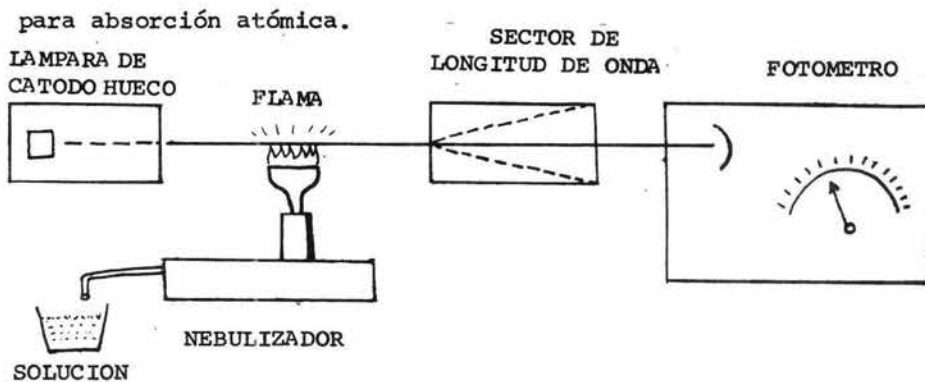
Equipo:

- 1.- Espectrofotómetro PM QII (para absorción atómica)
- 2.- Espectrofotómetro PM 4 (para los métodos colorimétricos)

El espectrofotómetro PM QII se compone básicamente de las siguientes partes:

- a) Quemador
- b) Lámpara de cátodo hueco
- c) Monocromador
- d) Fotómetro

Representación esquemática de un fotómetro de flama --



Fundamento:

El espectrofotómetro de flama mide la absorción o emisión de la radiación de átomos o moléculas excitadas que se hallan en la flama. Por ello, para el fotómetro no sólo es interesante el principio de medición, sino también el método de

producir la flama, ya que ésta determina el grado de disociación y el grado de la excitación térmica (14).

Producción de la flama.- El gas combustible llega al quemador, después de pasar por un flujómetro y relé de gas combustible. El aire fluye por otro flujómetro, por la boquilla de pulverización y llega a la cámara de pulverización, desde la cual pasa al quemador. Antes de llegar al quemador, el aire y el gas combustible son mezclados

Por otro tubo se conduce aire adicional a la cámara -- de combustión, que alimenta la flama desde el exterior con -- oxígeno, de modo que el aire del laboratorio puede ser aislado de la flama.

En la cámara de pulverización se produce una mezcla -- compuesta de aire de la solución procedente de la probeta. -- Mientras que las gotitas de gran tamaño son separadas y fluyen hacia abajo, las menores pasan por las aberturas, junto -- con el aire, al interior de la cámara de pulverización y a la flama.

La temperatura de la flama del fotómetro produce la -- energía necesaria para la disociación de las moléculas y la -- excitación térmica de los átomos de una substancia a analizar. Sin embargo a medida que sube la temperatura no sólo aumenta el grado de disociación y de excitación, sino también, por lo general el grado de ionización indeseable de los átomos. La -- elección de la temperatura de la flama y, por consiguiente, la

elección del gas combustible dependen de la substancia a analizar. En el caso específico del calcio se utiliza aire-acetileno (14).

Todos los elementos tienen un espectro de absorción -- característico. Sus rayas de absorción son idénticas a algunas de sus líneas de emisión. Por este motivo se denominan también líneas de resonancia. Por consiguiente, para poder determinar un elemento tanto cuantitativa, como cualitativamente, es necesario disponer de una fuente de radiación que tenga, -- por lo menos, una línea de emisión con la frecuencia de una línea de absorción del elemento, a determinar. Tales fuentes de radiación, existen para casi todos los elementos metálicos y algunos no metálicos, en forma de las llamadas lámparas de cátodo hueco (LCH). En una lámpara de cátodo hueco, el espectro de emisión de un elemento es producido por la excitación eléctrica de sus átomos. Por lo general, para cada elemento se necesita una lámpara especial de cátodo hueco; sin embargo, últimamente puede disponerse también de lámparas de cátodo hueco para varios elementos.

La radiación procedente de la lámpara de cátodo hueco es modulada por el diafragma oscilante con la frecuencia de la red y atraviesa la flama tres veces, antes de pasar por el monocromador, para incidir finalmente en el receptor fotoeléctrico, que transforma su intensidad en una señal eléctrica, -- cuya magnitud puede leerse en el instrumento indicador como --

medida de la intensidad de la radiación.

Una vez que la radiación de la lámpara de cátodo hueco ha atravesado tres veces la flama, una determinada parte de su intensidad primitiva ha sido absorbida; la magnitud de esta parte absorbida depende de la longitud de onda, de la temperatura de la flama, así como de la índole y de la concentración del elemento dentro de la flama. La longitud de onda de la radiación que debe incidir en el receptor fotoeléctrico, puede regularse mediante el monocromador.

Para la determinación cuantitativa de un elemento, se mide la extinción de la flama que contiene este elemento, haciendo la comparación con la extinción de la flama pura que se toma como $E = 0.A$ partir de la extinción de la flama puede determinarse la concentración de la prueba.

El espectrofotómetro PM 4, contiene una lámpara de incandescencia 6V 30W para un rango espectral entre 1000 y 320 nm y una lámpara de hidrógeno tipo H30 DS para el rango entre 330 y 200 nm. La reproducción óptica se realiza mediante un espejo cóncavo, asentado en una columna giratoria.

MATERIAL DE LABORATORIO.

El lavado del material es sumamente importante para evitar el máximo contaminaciones con calcio, ya que este elemento ocupa el sexto lugar en abundancia dentro de la corteza terrestre. (6).

Lavado del material: Después de que se lava como el --- demás material de laboratorio, debe enjuagarse de cinco a diez veces con agua deionizada, una con HCl 0.5 N (para arrasar --- trazar las trazas de Ca) y otras cinco veces más con agua deionizada. (10).

Se utilizaron micropipetas Lang-levi de 20 y 50 microlitros, las cuales tienen una exactitud de $\pm 5\%$, pipetas volumétricas y graduadas, tubos de ensayo, matraces volumétricos, cubetas OS (ancho exterior 12.5 mm, amplitud interior 10 mm).

MATERIALES DE REFERENCIA.

Patrón primario.- Como patrón primario se utilizó CaCO_3 (SRM 915), material certificado por la NBS (National Bureau of Standards) como una sustancia química de pureza conocida ($99.99 \pm 0.003\%$) (13). Este material debe conservarse en un frasco bien tapado a temperatura ambiente. En condiciones apropiadas de almacenamiento, la experiencia de la NBS indica que es estable por diez años cuando menos.

Patrón secundario.- Para tales fines se utilizó CaCO_3 de los laboratorios Merck con una pureza de 99% mínimo.

Se usaron dos materiales de control: 1) sueros-control-comerciales (lab-trol) y 2) un lote de suero control preparado en el laboratorio. El lab-trol, es un producto líquido preparado de plasma proteinizado de bovino, ajustado en los niveles de electrolitos y de otros constituyentes por la adición de compuestos químicos puros. Tiene propiedades físicas y químicas.

micas similares a los sueros de pacientes. Para el suero control preparado en el laboratorio se dializaron aproximadamente 100 ml. de suero humano hasta la eliminación casi completa de calcio, adicionándole posteriormente Cloruro de calcio en cantidad aproximada de 3 mEq/l. La concentración "real" de calcio en esta mezcla de sueros resultó de 3.40 ± 0.114 (2 DS) mEq/l en una serie de 39 determinaciones y de 3.412 ± 0.13 (2 DS) mEq/l en una 2a. serie de 41 determinaciones todas por el método de absorción atómica (véanse los cuadros 1 y 3).

En este momento cabe recordar los términos de exactitud, precisión, DE (desviación estándar) y CV (coeficiente de variación):

Precisión, describe el grado en que conciden las mediciones. La desviación estándar (DE), es una de las estimaciones más útiles de la precisión y también lo es el coeficiente de variación (CV). A partir del coeficiente de variación, se pueden calcular los límites de confianza para cualquier nivel de concentraciones del compuesto en estudio.

Exactitud, describe la medida en que los resultados coinciden con un valor conocido, cierto o aceptado como tal.

B) METODOS DE PRUEBA:

1.- DETERMINACION COLORIMETRICA DIRECTA DE CALCIO EN SUERO UTILIZANDO O-CRESOLFTALEINA COMPLEXONA.

PRINCIPIO.

La o-cresolftaleína complexona (OCFC) actúa como un indicador ácido base así como un indicador de metales alcalinotérricos. El colorante forma un cromóforo con el calcio solamente en condiciones alcalinas. La intensidad de color se obtiene en un rango de pH que va de 10.5 a 12.0, por encima del cual el colorante ya no actúa como indicador de metales. (10) El procedimiento no requiere desproteínización y no hay interferencias debidas al fósforo, magnesio, bilirrubina, hemoglobina y albúmina. La linealidad se extiende hasta 9 mEq/l (18 mg/dl) (9).

REACTIVOS:

a) Solución madre.- Un litro de solución contiene 500-ml de dietanolamina y 500 ml de dietilamina con 80 mg de o-cresolftaleína complexona, 2.0 Gm de polivinilpirrolidona (PVP) y 2,5 Gm de 8-hidroxiquinoleína. Esta solución debe guardarse en un frasco ámbar a temperatura ambiente y es estable por lo menos seis meses.

b) Solución de trabajo.- Se prepara diluyendo la solución madre con agua deionizada en relación de 1:5, es estable por dos días a temperatura ambiente.

c) Solución estándar de Ca.- Pesar 2.4970 Gm del estándar primario de CaCO_3 y disolverlos en 500 ml de HCl 0.1 N, aforar a un litro con agua deionizada. Esta solución tiene una

concentración de Ca de 100 mg/dl. Para preparar la curva de --
calibración se hacen diluciones de esta solución.

TECNICA.

Poner 3.0 ml de la solución de trabajo en un tubo de en-
sayo, 0.5 ml de la solución madre, 2.5 ml de agua deionizada y
0.020 ml de muestra (suero problema, control, estándar o blan-
co), mezclar bien y leer a 570 nm contra un blanco reactivo en
un espectrofotómetro o colorímetro, a los 15 minutos. La con-
centración de la muestra se determina por medio de la curva de
calibración.

La OCFC es inestable a pH alcalino, por lo tanto, debe-
guardarse en soluciones ácidas que son alcalinizadas al medir-
el calcio. En este caso el problema de inestabilidad fué re-
suelto por los autores (9), preparando el reactivo en solución
nonacuosa de dietanolamina. Con la adición de agua deionizada-
al preparar el reactivo de trabajo resulta un amortiguador con
un pH de 11.5. La dietilamina fué incorporada para reducir la-
viscosidad de la solución madre. Las propiedades antioxidantes
de la dietilamina y dietanolamina evitan la decoloración de la -
OCFC por lo menos durante seis horas.

La 8-hidroxiquinoleína forma complejos con el magnesio y
previene de esta forma interferencias, que de otra manera pue-
den ser causadas por éste. Una concentración de magnesio en la
muestra de 10 mg/dl produce una elevación de Ca de 0.1 mg/dl,-

lo cual se evita con la adición de 8-hidroxiquinoleína (11).

2.- METODO COLORIMETRICO PARA LA DETERMINACION CUANTITATIVA DE CALCIO SERICO Y URINARIO (EQUIPO COMERCIAL DE LOS LABORATORIOS WIENER). (CC)

PRINCIPIO:

Este método al igual que el anterior, está basado en la reacción del calcio con la OCFC a un pH 11.0, dando un color magenta que se mide fotocolorimétricamente a 570 nm.

REACTIVOS.

a) Reactivo de OCFC.- 3.5 ml de solución estabilizada de o-cresoltaleína complexona 3.7 mmol/l.

b) Amortiguador.- 220 ml de aminometilpropanol 0.2 mol/l en metanol 35% V/V para un pH 11.0

c) Estándar.- 4 ml de la solución estabilizada de calcio. Se procesa igual que la muestra y equivale a 10 mg/dl.

Todos los reactivos son estables dos años a temperatura ambiente.

TECNICA.

En dos tubos de fotocolorímetro marcados E (Estándar) y D (Desconocido) colocar:

	E	D
Reactivo OCFC	100 ul	100 ul
Amortiguador	7 ml	7 ml

Mezclar con 3 ó 4 movimientos de la varilla mezcladora.
Leer la absorbancia en espectrofotómetro a 570 nm o fotocolorímetro

metro (blanco interno), llevando el aparato a cero con agua,-

Agregar luego:	E	D
Estándar	50 ul	-
Muestra	-	50 ul

Mezclar con varilla mezcladora y repetir las lecturas.

Microtécnica.- La determinación puede efectuarse empleando 20 ul de muestra y estándar, 50 ul de reactivo de OCFC y 3.5 ml de amortiguador.

Cálculos: Corregir las lecturas de E y D restándoles los respectivos blancos internos.

$$\text{Ca mg/dl} = D \times \text{factor}$$

$$\text{factor} = \frac{10 \text{ mg/dl}}{E}$$

3.- DETERMINACION COLORIMETRICA DE CALCIO EN FLUIDOS BIOLÓGICOS CON AZUL DE METILO TIMOL.

PRINCIPIO

El mismo que el de los dos métodos anteriores.

REACTIVOS.

a) Solución colorante madre.- Un litro de solución acuosa contiene 180 mg de la sal sódica de azul de metilo timol (AMT), 6.0 Gm de PVP, 7.2 Gm de 8-hidroxiquinoleína, y 10.0 ml de HCl conc. Esta solución anaranjada es estable por lo menos nueve meses a temperatura ambiente.

b) Solución base madre.- Un litro de solución acuosa-

contiene 24 Gm de sulfito de sodio y 220 ml de monoetanolamina. Es estable por lo menos nueve meses a temperatura ambiente.

c) Reactivo de trabajo.- Mezclar volúmenes iguales de las dos soluciones anteriores (a y b). Es estable por lo menos dos días, el pH es de 12 ± 0.3 . No debe guardarse en refrigeración para prevenir los efectos de los cambios de temperatura en la mezcla final.

d) Solución estándar de calcio. Es la misma que se utiliza en el método de OCFC.

TECNICA.

Colocar con un autodilutor 0.050 ml de muestra (estándar, blanco, desconocido) y 0.45 ml de agua deionizada en un tubo de ensayo.

A cada tubo de ensayo adicionarle 3.0 ml del reactivo de trabajo y mezclarlos. Leer de inmediato a 612 nm.

El azul de metilo timol es un indicador ácido-base que puede ser utilizado a un pH de 11.5 a 12.5. La 8-hidroxiquinoleína y el PVP se utilizan con el mismo fin que para el método de la OCFC.

La decoloración parece deberse a la oxidación del material de color a un pH alto, la cual se previene por la adición de un reductante. El sulfito de sodio fué seleccionado porque la doble carga del ión sulfito establece la fuerza iónica lo suficientemente alta para no ser cambiada por la adición de --

suero o plasma. El sulfito estabiliza el color del complejo - calcio-colorante por lo menos 12 horas a temperatura ambiente. La monoetanolamina sirve como amortiguador.

VI.- RESULTADOS

A continuación presentamos los resultados obtenidos -- cuando determinamos calcio por los métodos de EAA, o-CFC, CC- y AMT. Dichas determinaciones fueron llevadas a cabo bajo estudios de reproducibilidad; en suero dializado con una cantidad conocida de calcio (suero control), en suero comercial -- (labtrol) y en una solución acuosa de CaCO_3 de referencia, -- también con una cantidad conocida (patrón clínico primario). -- Posteriormente se determinó calcio en sueros de pacientes del Hospital del Niño DIF no seleccionados.

Dichos estudios se separaron en dos grupos: primer grupo (G I), los estudios de reproducibilidad y los sueros fueron probados por los métodos de EAA, o-CFC y CC (tablas 1 y 2), y en el segundo grupo (G II), se efectuaron los mismos estudios pero únicamente para los métodos de EAA y AMT (tablas 3- y 4).

Para facilitar el análisis estadístico ya que las determinaciones de Ca en suero de pacientes no fué una población seleccionada, se procedió a separar dichos valores en -- tres diferentes niveles: a) bajo (2.45-3.45), b) medio (3.46-4.46) y c) alto (4.47-5.47 mEq/l), esto fué hecho con el objeto de reducir las variaciones de los resultados.

T A B L A I

RESULTADOS EN LOS ESTUDIOS DE REPRODUCIBILIDAD PARA EL GRUPO I

METODO	MATERIAL DE REF.	No. DE PRUEBAS	\bar{X}	DE	CV%	F
EAA	Suero Control	39	3.4	0.057	1.68	
o-CFC	" "	39	3.68	0.2978	8.09	28.10
CC	" "	38	2.9	0.4623	15.94	66.68
EAA	Lab-Trol	20	4.73	0.1269	2.68	
o-CFC	" "	20	4.68	0.2619	5.59	4.25
CC	" "	20	4.72	0.5500	11.65	18.90
EAA	Patrón clínico primario	20	5.00	0.1012	2.024	
o-CFC	" "	20	5.02	0.4877	9.715	24.46
CC	" "	20	4.89	0.2855	5.83	14.19

EAA.....ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA

o-CFC.....ORTO CRESOLFTALEINA COMPLEXONA

CC.....CALCIO COLOR

T A B L A 2

RESULTADOS DE LOS SUEROS PARA EL GRUPO I

METODO	No. DE DET.	NIVEL	\bar{X}	DE	F.
EAA	11	bajo	3.20	0.2886	
	49	medio	4.08	0.2956	
	65	alto	4.89	0.3072	
o-CFC	11	bajo	3.44	0.7855	7.4
	49	medio	4.29	0.7600	6.61
	65	alto	5.06	0.8543	7.73
CC	12	bajo	3.33	1.3143	21.72
	44	medio	4.13	1.25	18.6
	63	alto	4.99	1.09	13.59

T A B L A 3

RESULTADOS EN LOS ESTUDIOS DE REPRODUCIBILIDAD PARA EL GRUPO II

METODO	MATERIAL DE REF.	No. DE PRUEBAS	\bar{X}	DE	CV%	F
EAA	Suero Control	41	3.412	0.065	1.905	
AMT	" "	41	3.16	0.139	4.400	5.0
EAA	Lab-Trol	15	4.64	0.1018	2.19	
AMT	" "	15	4.45	0.2531	5.69	6.274
EAA	Patrón clínico primario	15	4.98	0.046	0.935	
AMT	" "	15	4.71	0.3089	6.55	31.88

EAA.....ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA

AMT.....AZUL DE METILO TIMOL

T A B L A 4

RESULTADOS DE LOS SUEROS PARA EL GRUPO II

METODO	No. DE DET.	NIVEL	\bar{X}	DE	F
EAA	12	bajo	3.29	0.2027	
	62	medio	4.22	0.2917	
	38	alto	4.79	0.2350	
AMT	12	bajo	2.94	0.5772	8.10
	62	medio	3.93	0.7255	6.18
	38	alto	4.42	0.9740	15.16

T A B L A 5

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE "F" EN LOS ESTUDIOS DE REPRODUCIBILIDAD CUANDO COMPARAMOS LOS METODOS DE o-CFC, CC Y AMT ENTRE SI.

MATERIAL PROBADO	o-CFC vs CC	o-CFC vs AMT	CC vs AMT
SUERO CONTROL	2.41	4.50	11.06
LAB-TROL	4.41	1.07	4.72
PATRON CLINICO PRIMARIO	2.90	2.50	1.16

VII.- DISCUSION

A.- RESULTADOS.

Ya que nosotros hemos efectuado el análisis del mismo material por varios métodos en los mismos días, ahora estamos en posibilidades de comparar su ejecución y de responder a cerca-- de su precisión y exactitud.

Los valores de la tabla 1 representan los análisis efectuados por replicado, cuando determinamos calcio en el suero -- control, en el labtrol y en el patrón clínico primario por los métodos de EAA, OCFC y CC.

Es obvio que estos tres métodos producen diferentes resultados, ya que cuando nosotros comparamos los CV para el suero control, encontramos que el del método de referencia en excelente comparado con los de los métodos de prueba, 1.68 vs 8.09 y - 15.94% respectivamente (EAA vs OCFC, CC), así también es notorio que el método de CC da niveles promedios más bajos comparativamente.

Por otra parte, existe diferencia en precisión de los métodos, ya que la prueba de F fué de 28.10 y 66.68 respectivamente (EAA vs OCFC, EAA vs CC) los que exceden marcadamente el nivel de significancia al 95%.

Con el lab-trol nuestros análisis de Ca por replicado con los métodos ya mencionados, se observó lo siguiente.

El CV obtenido con el método de EAA resultó ser menor a los de los métodos de prueba, (EAA= 2.68%, OCFC= 5.59%, CC=11.65%)

La prueba de F nos demostró que la precisión de estos métodos es diferente cuando se comparan con el método de referencia, F para EAA vs OCFC= 4.25 y para EAA vs CC= 18.90.

El patrón clínico primario fué analizado por replicado con los métodos anteriores, mostrándonos lo siguiente:

Los métodos de prueba mostraron tener CV más altos que el método de referencia (EAA= 2.024%, OCFC= 9.715% y CC= 5.83%).

La prueba de F para EAA vs OCFC fué de 24.46 y para EAA vs CC de 14.19 ambas exceden los valores tabulados a un nivel del 95% de significancia.

Análisis de los resultados de los sueros que se trabajaren con los métodos de EAA, OCFC y CC (Tab. 2).

En los sueros los valores promedios para los métodos de OCFC y CC en sus tres diferentes niveles (bajo, medio y alto), son ligeramente más elevados que para el método de referencia.

La precisión de estos métodos (OCFC y CC) es diferente a la del método de referencia, esto fué demostrado al encontrar la prueba la F mayor a la tabulada a un nivel del 95% de significancia en los tres niveles de los sueros.

A continuación presentamos el análisis de los resultados obtenidos en los estudios de reproducibilidad por los métodos de EAA y AMT (Tab. 3).

Los promedios para el método de AMT en los tres materiales probados (control interno, lab-trol y patrón clínico prima-

rio) tendieron a ser ligeramente más bajos que los de EAA.

Los CV para el método de referencia estuvieron entre el 1 y 2% y para el de AMT entre el 4 y 6%. Nótese que los CV para el método de AMT son menores que los obtenidos con los métodos de o-CFC y CC (Tab. 1).

Cuando comparamos los métodos entre sí (EAA vs AMT) en los tres materiales analizados, obtuvimos que la prueba de F -- con el control interno fué de 5.0, con el lab-trol de 6.27 y -- con el patrón clínico primario de 31.88. En los tres casos los valores obtenidos para la prueba de F exceden al valor tabulado a un 95% de significancia.

Análisis de los resultados de los sueros que se trabajaron con los métodos de EAA y AMT (Tab. 4).

Los promedios para el método de AMT tendieron a dar ligeramente más bajos que los obtenidos con el método de referencia.

La prueba de F para los sueros en sus tres niveles (bajo medio y alto) resultó mayor a la tabulada, lo que nos indica -- que existe diferencia en precisión entre estos dos métodos (EAA vs AMT).

Cuando comparamos la precisión de los métodos colorimétricos entre sí, observamos que la prueba de F resultó para la mayoría de los materiales probados en los estudios de reproducibilidad superior a la tabulada a un nivel de significancia del 95%, no siendo así en los renglones para lab-trol o-CFC vs AMT-

y para el patrón clínico primario-CC vs AMT. (Tab. 5).

B.- METODOS.

En el método de referencia la única modificación que se hizo, fue la dilución, en éste se recomienda hacer una dilución 1:50, pero el espectrofotómetro PM-Q11 no posee una sensibilidad tan grande para dicha dilución. Por tal motivo la dilución escogida fué 1:20, que es la que usualmente se recomienda (14).

En el método de la OCFC, a pesar de lo que los autores-- indican (9), nosotros observamos que el reactivo de trabajo, no es estable por dos días, en realidad, ni siquiera por varias horas, sino que debe de leerse durante la primera media hora. El pH de la solución de trabajo, no resulta de 11.5, sino de 12.5, por lo tanto fué necesario ajustarlo a un pH de 11.5 con HCl 5-N, pues trabajando a pH 12.5, todos los puntos de la curva están dar se leían entre 95 y 100% T, lo que hacía imposible graficar los, además, se obtenía la misma lectura para diferentes concentraciones de calcio. De esta forma comprobamos lo importante -- que es el pH para que se forme el complejo calcio-OCFC.

En nuestra experiencia el procedimiento es lineal cuando menos hasta 7 mEq/l. La solución madre fué probada con reactivos de Baker, como aconsejan los autores (9); se probaron los de Merck, pero el color resultó menos estable.

Para el método de CC (equipo comercial de los laboratorios Wiener) no fué posible hacer para cada muestra un blanco interno, por no contar con las cubetas adecuadas. Por tal razón

se leyó contra un blanco de color que se llevaba a 100% T. A - nuestro parecer, no creemos que esto haya alterado de forma sig .nificativa la reacción, puesto que el material que utilizamos - para este trabajo, estaba perfectamente bien lavado. El blanco interno que recomienda la casa fabricante, sirve para hacer correcciones por la presencia de sales de calcio como contaminantes.

Al método de AMT, no tuvimos necesidad de hacerle ninguna modificación. El color es estable cuando menos una hora, aun que se hayan leído de inmediato.

Como conclusiones de índole general, es necesario recomendar cautela en el uso de métodos distintos al de referencia, ya que en algunos casos difícilmente se obtendrán resultados dentro de límites de confianza aceptables. Por último se recomienda establecer un sistema satisfactorio de control de calidad -- que, como ya se indicó en capítulos anteriores, puede estar basado en el uso de materiales comerciales o en un "suero control" preparado en el laboratorio y valorado por el método de referencia.

VIII - CONCLUSIONES

El uso de materiales de referencia, en este caso CaCO_3 - (SMR 915), para determinar Ca en fluidos biológicos, y de métodos de referencia como el de EAA, permite mejorar la exactitud de las determinaciones en el laboratorio clínico, según ha sido reportado por diversos investigadores y confirmado en este trabajo para calcio en suero.

Debido a la relativa complejidad del método de EAA y al costo del equipo es indispensable disponer de alternativas metodológicas que satisfagan los niveles mínimos aceptables de exactitud y de precisión, de acuerdo a normas nacionales o internacionales. Entre los numerosos métodos que han sido desarrollados para la cuantificación de calcio en suero, fueron sometidos a un estudio comparativo con el método de referencia dos métodos colorimétricos cuyas ventajas prácticas han permitido corroborar las excelentes características de reproducibilidad del método de EAA para Ca, y de determinar diferencias estadísticamente significativas en la precisión de los métodos colorimétricos, no sólo respecto del método de EAA sino entre sí.

De los métodos colorimétricos estudiados, el de AMT presentó CV y DE mas bajos a lo que debe de agregarse ventajas como sencillez en la ejecución y estabilidad de los reactivos, -- por lo cual debe considerársele preferible al otro en cualquiera de las dos variantes probadas.

Los métodos de prueba (o-CFC, CC y AMT) en general mos--

traron ser totalmente diferentes en cuanto a precisión y exactitud respecto al método de referencia, resultando el método de - . AMT el mejor por las razones antes dichas.

Los laboratorios que cuentan con equipo de EAA deberían tratar de verificar con la mayor frecuencia posible el funcionamiento del sistema analítico, por lo que toca a la exactitud de los resultados, utilizando un patrón clínico primario (CaCO_3 de referencia).

El uso de sueros control de fuente comercial puede ser - satisfactorio para mantener control de la precisión, pero para alcanzar la máxima exactitud es indispensable el patrón clínico primario.

IX - R E S U M E N

La determinación de Ca en suero y orina, es un valioso-auxiliar en el diagnóstico de alteraciones del metabolismo del Ca, pero lo cual, es necesario utilizar métodos que garanticen resultados dentro de límites de confianza aceptables. El método basado en el principio de absorción atómica, primer método de referencia aceptado internacionalmente, ofrece la precisión necesaria y es razonablemente sencillo, pero exige contar con equipo costoso. Los laboratorios que no cuentan con un instrumento de absorción atómica, deben recurrir a procedimientos alternativos, sobre todo de tipo colorimétrico o espectrofotométrico. En este trabajo han sido evaluados dos métodos de este tipo (OCFC y AMT), el primero de ellos en dos variantes (con reactivos preparados en el laboratorio y en forma de equipo comercial), en comparación con el método de referencia para Ca, utilizando además un patrón clínico primario preparado con material de referencia certificado por la National Bureau of Standards.

Se confirmó la bondad del método de referencia para Ca, que permitió obtener CV entre 1 y 2%. Los resultados obtenidos en la evaluación de los métodos colorimétricos indicaron que el método basado en azul de metilo-timol (AMT), permite obtener valores más cercanos a la realidad y con menor dispersión.

X.- APENDICE

PROLOGO

Este método de referencia para la determinación de calcio en soluciones acuosas o suero, es el primer método de referencia desarrollado para el uso en química clínica. Su desarrollo fue durante los años de 1969 a 1973. Con el estímulo del Consejo Ejecutivo de la Federación Internacional de Química -- Clínica en Ginebra en 1969, la NATIONAL BUREAU OF STANDARDS estuvo de acuerdo en proveer los servicios y coordinación necesaria para la dirección técnica y una cadena de laboratorios clínicos para desarrollar el método de referencia. La historia de este esfuerzo, incluyó la cooperación de expertos y laboratorios, los resultados de este trabajo están descritos en forma completa (5). Este trabajo fue un desarrollo lógico de las investigaciones meticulosas llevadas a cabo por Pybus, Feldman y Bowers (7) los cuales establecieron la forma básica para este método de referencia. En 1973 se publicó una versión del método de referencia en Clinical Chemistry (6). Desde el punto de vista de los miembros de este subcomité de la NCCLS ese protocolo debería considerarse actualmente solo un ejemplo histórico interesante que ilustra el principio de que "un patrón debe ser un organismo viviente y cambiante". Ambos protocolos, el original publicado por la NBS (5) y la versión publicada en 1973 (6), al compararse con este protocolo, resultaron deficientes en la claridad del lenguaje y contienen indicaciones -

que pueden tener más de una interpretación. Consideramos que esta versión es tan poco ambigua como es posible, considerando los múltiples parámetros que no pueden ser descritos completamente en términos inequívocos.

El método ha sido probado rigurosamente en la Gran Bretaña (9) y está en constante uso en el Centro para Control de Enfermedades de Atlanta, GA. Las quejas más escuchadas fueron lo tedioso y el gran tiempo que se requiere para ejecutar este método. El uso de pipetores automáticos para acelerar la preparación de soluciones estándares, muestras, etc., ha ayudado a disminuir este problema. Si se demuestra que no afecta la exactitud esta opción será sin duda incorporada en la primera revisión del método de referencia.

METODO DE REFERENCIA PARA CALCIO TOTAL EN SUERO

INTRODUCCION.

La necesidad de exactitud en química clínica es ampliamente aceptada. Copeland y colaboradores (1) han establecido que "hay en el momento actual un interés creciente en el uso de pruebas de laboratorio para la detección temprana de estados patológicos, con el fin de prevenir más tarde manifestaciones de enfermedades. Las enfermedades crónicas, también requieren un seguimiento a largo plazo. Esto requiere que las mediciones del laboratorio para la atención del paciente sean comparables a lo largo del tiempo (que puede ser por toda la vida del paciente) y (en la población móvil de los ESTADOS UNIDOS) y en diferentes condiciones desde el punto de vista geográfico". Una filosofía analítica basada en exactitud permitirá alcanzar estas metas más que cualquier otro enfoque.

En todos los sistemas analíticos, es más probable alcanzar la exactitud, cuando se siguen estos tres criterios.

- 1.- Estar de acuerdo sobre una base de unidades de medición.
- 2.- Producir un material de referencia bien caracterizado, por ejemplo, un material cuyas propiedades sean exactamente conocidas.
- 3.- Usar este material con un método de referencia de exactitud y precisión probada y demostrada.

Aplicando estos criterios para la medición de calcio -

en suero se nota que:

1.- Hay acuerdo en el peso atómico (2) y las definiciones de mole, kilogramo y litro (3) han sido establecidos.

2.- El CaCO_3 está en disponibilidad como un material estándar de referencia (SMR 915) en la NATIONAL BUREAU OF STANDARDS; y

3.- Se dispone ya, como resultado de este trabajo de un método de referencia, de exactitud y precisión conocida.

Gracias a que ya han sido producidos todos los componentes que se requieren, es posible referir ahora todas las mediciones de calcio total en suero a una base común de exactitud. Puesto que parece imposible estandarizar los resultados de diversos laboratorios sobre alguna otra base que la máxima exactitud alcanzable, el primer paso hacia esta meta es contar con un método de referencia.

Una completa descripción de los razonamientos que condujeron al desarrollo de métodos de referencia ha sido incluida en el reporte de Cali (4) y también ha sido publicada (5,6) una descripción completa del desarrollo del método de referencia para calcio total en suero. Ese trabajo a su vez se derivó y basó del trabajo de Pybus, Feldman y Bowers (7).- Los científicos interesados en repetir el trabajo, deberían consultar el reporte completo, (5). Ya que esta proporción sólo incluye el alcance, las limitaciones y un protocolo para -

el Método de Calcio Sérico total.

El establecimiento de la exactitud de un proceso de medición a partir solamente de principios primarios es difícil y lento.

Si existen métodos exactos contra los cuales puedan ser comparados y evaluados los errores sistemáticos del método candidato, entonces el tiempo y el esfuerzo necesarios para su desarrollo pueden ser reducidos considerablemente.

Por fortuna existe un método definitivo para Ca, que -- aún no había sido aplicado a el análisis de fluídos biológicos. El calcio puede determinarse fácilmente con una exactitud que esta dentro del 0.2% de el valor "verdadero o absoluto" obtenido por un método basado en dilución isotópica de espectrometría de masa. Por no estar esta técnica generalmente disponible en los laboratorios de química clínica, no se ha podido -- usar directamente como método de referencia. Ya que este ha sido descrito en detalle en otras publicaciones (5, 8) no se describirá aquí.

1.0. ALCANCE.

1.1. Este método abarca la determinación de valores exactos para la concentración de calcio en soluciones acuosas o suero (5). El método no asegura que el muestreo sea adecuado. Sin embargo si se obtiene una muestra representativa, el método -- producirá un valor exacto para calcio total en esa muestra.

1.2 Sujeto a ciertas limitaciones, si el método de referencia se trabaja exactamente como se ha descrito la concentración de Ca total en suero puede ser determinada con un $\pm 2\%$ del valor verdadero. El método ha sido evaluado solamente en tres límites de concentración de 1.5 a 3 mmol/l (6 a 12 mg/100 ml).

Es de hacer notar que este es un método de referencia y que generalmente no es apropiado para uso rutinario de un laboratorio clínico por el volumen de la muestra requerida y por el tiempo y las precauciones necesarias para el análisis.

2.0. SIGNIFICACION.

2.1. La utilidad primaria del método es como sigue:

2.1.1. Establece el valor exacto para Ca total en suero.

2.1.2. Establece la validéz de métodos para calcio total utilizando diversos Kits, juegos de reactivos y sistemas analíticos.

2.1.3. Sirve como un método contra el cual la exactitud de otros métodos usados en la rutina para Ca total puedan ser probados; y

2.1.4. Sirve como un método para ser utilizados por fabricantes de materiales de referencia secundarios para calcio, sueros control, etc., para establecer y asegurar la calidad de sus productos.

3.0 CONDICIONES NECESARIAS.

3.1. Para alcanzar la exactitud inherente en este método, deben cumplirse varias condiciones importantes.

3.11. Es esencial adherirse en forma absoluta al método.¹

3.12. Todo el material volumétrico de vidrio debe ser de la clase A NBS (10).

3.13. Todos los reactivos incluyendo el agua, deben cumplir las especificaciones definidas en este método.

3.2. Este método ha sido evaluado con tres diferentes modelos de espectrofotómetros de doble haz². No se sabe si --- otros instrumentos pueden proporcionar la estabilidad, precisión o linealidad necesarias para obtener la exactitud inherente al método de referencia. Cualquier instrumento que se use, debe trabajarse en óptimas condiciones con una linealidad y -- estabilidad máximas a lo largo de los límites.

Todas las pesadas, preparación, alicuotas de los estándares, blanco y problemas deben realizarse con gran cuidado para disminuir el error desde estos pasos a menos del 1%, así la exactitud total del método podrá lograrse.

¹Diferentes modificaciones han sido sugeridas por Pickup y colaboradores (9), sin embargo estas no han sido probadas rigurosamente, por lo que en momento actual no pueden ser consideradas alternativas en este método.

²Modelo 153, Laboratorio de instrumental, Inc., Lexington, -- MA, y modelos 303 y 403, Parkin-Elmer Corp., Norwalk, CT.

4.0 REACTIVOS Y MATERIALES.

4.1. Pureza de los Reactivos.- Reactivos de grado químico serán usados en todas las pruebas. Al menos que se indique de otra manera, se requiere que todos los reactivos se -- ajusten a las especificaciones del Comité de reactivos analíticos de la Sociedad Química Americana, donde tales especificaciones están disponibles. Pueden utilizarse otros grados de pureza siempre y cuando se averigüe que los reactivos son de pureza suficientemente elevada para permitir su uso sin disminuir la exactitud de la determinación.³

4.2. Pureza del agua.- El agua deionizada y destilada deben tener una resistencia específica de cuando menos 10^6 -- $\text{Ohm}^{-\text{cm}}$ a 25 °C. Debe estar disponible en gran cantidad para -- usarse como diluyente y para la operación final de lavado de todo el material de vidrio y aparatos que estén en contacto -- con las soluciones. Solamente agua de estas especificaciones debe ser usada.

4.3. Soluciones Patrones de Calcio.- Estas deben ser preparadas con CaCO_3 proporcionado y certificado por la National Bureau of St. Su número de identificación es SRM 915.

Este material debe secarse durante 4 horas a 200 °C. y

³Ver "Reagent Chemicals, American Chemical Society Specifications, 5th edition", American Chemical Society, Washington, DC, 1974. Para sugerencias del análisis de reactivos no enlistados por la Sociedad Química Americana, ver "Reagent Chemicals and Standards", por Joseph Rosin, D. Van Nostrand Co., Inc., New York, NY, 1967.

(Nota: El material de vidrio puede considerarse limpio, si durante el quinto enjuague con agua, el agua escurre de manera uniforme, dejando una película sobre toda la superficie entera. Cuando la película del agua no es pareja, esto indica que la superficie no quedó libre de proteínas, grasas, detergentes y otros contaminantes).

4.5. Oxido de Mlantano de alta pureza y que contenga menos de 15 ug de calcio por gramo (15 ppm.).

4.6. Cloruros de Sodio, de Potasio y de Estroncio. Estos materiales deben secarse sobre un desecante apropiado (ver 4.3), a presión normal antes de usarse.

5.0. PREPARACION DE REACTIVOS.

5.1. Solución blanco madre (140 mmol/l de NaCl y 5.0 --- mmol(1 de KCl). En un matr az volumétrico de un litro, adicio--nar 8.18 g de NaCl y 373 mg de KCl. Disolverlos en agua y llevar a la marca. Cuando esté a temperatura ambiente diluir para calibrar el volumen y mezclar por inversión seis veces. Dejar-

ponerse a temperatura ambiente en un desecador, usando un desecante apropiado (por ejem. óxido de aluminio anhidro).

4.40. Material de Vidrio.

4.41. Todo el material de vidrio (pipetas volumétricas de 10 ml. y matraces volumétricos de 500 ml.) deben ser de la clase NBS A. No debe usarse material de plástico en este procedimiento.

4.42. Todo el material de vidrio que esté en contacto con las soluciones patrones, reactivos, agua, diluyente o --- muestras deben haber sido previamente lavados.

4.421. Usar el método rutinario de lavado (agua caliente con detergentes no iónicos) enjuagar varias veces. Siempre que un material haya estado en contacto con proteínas deben enjuagarse 3 veces más con agua antes de proceder a su lavado.

4.422. Remojar toda la noche el material en HCl (1.0 -- mol/l).

4.423. Enjuagar enérgicamente con agua destilada (mínimo 5 veces).

4.424. Secar en un medio ambiente libre de polvo.

4.425. El material de vidrio limpio debe usarse sin secarse enjuagando 3 veces con la solución que se aplique por ejemplo pipetas, frascos para guardar o transferir.



reposar el matraz varios minutos e invertir seis veces más.

5.2. Solución diluyente (10 mmol/l de LaCl_3 y 50 mmol/l de HCl). Prepare suficiente diluyente para el trabajo que se vaya a realizar en series continuas. Transfiera 1.63 g de La_2O_3 a un matraz de un litro y 10 ml. de agua y adicione lentamente 6.7 ml de HCl concentrado. Después de que el La_2O_3 se ha disuelto completamente. Diluya con agua hasta el cuello del matraz. Cuando la solución esté a temperatura ambiente, afore -- hasta la marca y mezcle por inversión.

(Nota: Si se usa una referencia interna, adicione 30.6 mg/l de $\text{SrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).

5.3. Soluciones madre estándares de calcio.- Preparar un mínimo de tres concentraciones de 2.00, 2.50 y 3.00 mmol/l de Ca, cada matraz contiene 140 mmol/l de NaCl y 5.0 mmol/l de KCl. A cada uno de los tres matraces de un litro, se adiciona 8.18g de NaCl y 373 mg de KCl. Al primer matraz (2.00 mmol/l de Ca), adicionar 200.2 mg. de CaCO_3 ; al segundo matraz (2.50 mmol/l de Ca), adicionar 250.2 mg de CaCO_3 ; y a el tercer matraz -- (3.00 mmol/l de Ca), adicionar 300.3 mg de CaCO_3 . En cada uno de los matraces, poner de 10 a 20 ml de agua y 1 ml de HCl concentrado. Asegurese de que todo el CaCO_3 esté en solución antes de diluir con agua al cuello. Cuando estén a temperatura ambiente, se afora y se mezcla por inversión 30 veces. Etiquetar todos los matraces apropiadamente.

(Nota: Experiencias subsecuentes han indicado lo conveniente de usar soluciones estándares de concentraciones intermedias. (2.25 y 2.75 mmol/l).).

6.0 PROCEDIMIENTO PARA LA DILUCION.

6.1. Todas las soluciones deben estar a temperatura ambiente relativamente constante. Diluir todas las soluciones 50 veces, excepto el diluyente, incluyendo las muestras problemas, usando pipetas volumétricas de 10 ml y matraces volumétricos de 500 ml. Usar solamente una pipeta de 10 ml para reducir los errores causados por los diferentes tiempos de drenaje entre soluciones acuosas, ácidos diluídos y sueros, y para eliminar los errores causados por las diferencias volumétricas entre pipetas:

6.2. Preparación del blanco, de la solución estándar de trabajo y de los problemas.

6.21. Transferir a un matraz volumétrico de 500 ml, -- 450 ml de la solución diluyente madre. Adicionar 10 ml de la solución blanco madre. Después de que haya caído todo el contenido de la pipeta soplar suavemente con un bulbo. Enjuagar la pipeta tres veces con el diluyente que está en un pequeño frasco limpio, cada vez retornar el contenido de la pipeta a el matraz.

6.22. Diluir para calibrar el volumen con diluyente y-

mezclar cuidadosamente treinta veces. Dejar reposar.

6.23. Dejar la pipeta dentro de un frasco limpio con agua.

Llevar a la marca y descartar.

6.24. Llenar la pipeta 1 o 2 mm por arriba de la marca con solución estándar de 2.00 mmol/l de Ca. Descartar. Repetir este paso dos veces. Alternadamente, puede usarse el procedimiento descrito en el punto 6.27.

6.25. A un matraz volumétrico de 500 ml transferible -- el contenido de una pipeta de 10 ml de solución estándar madre de Ca de 2.00 mmol/l por la técnica descrita en los pasos 6.21, 6.22 y 6.23.

6.26. Repetir el paso 6.25 dos veces, pero usando las soluciones estándares de Ca de 2.50 y 3.00 mmol/l. Condicionando la pipeta cada vez (como en 6.24 usando la solución estándar madre adecuada).

6.27. Después de que las soluciones estándares y el -- blanco han sido diluídos y la pipeta ha sido enjuagada, aspirar de 2 a 4 ml de el primer problema con la pipeta. Colocar un dedo sobre el final de la pipeta y entonces retirar de el frasco de la solución problema. Inclinando la pipeta en una forma horizontal y rotar lentamente la pipeta para humedecer a fondo todas las superficies internas.

6.28. Llenar la pipeta a la marca con la solución pro

blema y ponerlo en un matraz volumétrico limpio de 500 ml que contenga de 200 a 300 ml del diluyente. Enjuagar la pipeta --- tres veces con la solución diluyente, colocando todas las en---juagadas en el matraz. Aforar el matraz con solución diluyente, y mezclar 30 veces por inversión.

(Nota: Durante la caída del contenido de la pipeta el - extremo de esta debe permanecer abajo de la superficie del di- luyente para prevenir la formación de espuma.

6.29. Enjuagar la pipeta con agua, acondicionándola -- con la siguiente solución desconocida, repetir los pasos 6.27 y 6.28 para cada uno de los problemas que se analicen.

(Nota: Si la solución en la que se enjuaga no humedece- completamente los lados de la pipeta, limpiar la pipeta varias veces en mezclas de ácidos fuertes (HCl, HNO₃, 3:1 por volu---men) entonces se repite el paso 6.29).

6.210. Después de concluir los procedimientos de dilu- ción tendremos lo siguiente:

(a) Un matraz volumétrico de 500 ml que contiene la di- lución 1:50 de la solución blanco. Rotular con la letra "B".

(b) Tres matraces volumétricos de 500 ml conteniendo -- las diluciones 1:50 de las soluciones estándares de calcio. Ro tularlos "2.00", "2.50" y "3.00" (mmol/l de Ca.)

(c) Varios matraces volumétricos de 500 ml contienen di luciones 1:50 de los problemas que han sido analizados. Etiqu e tar apropiadamente.

(Nota: Para mayor claridad en los pasos siguientes se -
considerará que hay desconocido etiquetado "X").

7.0. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA (EAA) PROCEDIMIENTO DE MEDICION.

7.1. Se asume que el operador está bien familiarizado con el instrumento a ser usado. No es posible en este método - dar instrucciones detalladas para asegurar la estabilidad del instrumento, linealidad, condiciones de la flama, etc. Solamente debe ser usado acetileno de la más alta pureza, déjese salir éste lentamente de tal manera que la acetona en el filtro poroso no sea eliminada. Pasar aire a través de una trampa de agua y un filtro. Algunos de los requerimientos para la estabilidad óptima en la determinación de Ca ha sido descrita detalladamente (5,6). Debe evitarse la inestabilidad causada por lo siguiente:

- 7.11. Fluctuación del voltaje de la línea principal.
- 7.12. Nebulizador ruidoso.
- 7.13. Inestabilidad electrónica.
- 7.14. Presión de acetileno por abajo de 60 psi (414kPa).
- 7.15. Condensación en la línea de aire.
- 7.16. Residuos de solventes en la cámara de premezclado en el sifón de drenaje.
- 7.17. Corrientes de aire en el cuarto.
- 7.2. En general, la exactitud máxima del método no po-

drá ser lograda al menos que el instrumento sea operado en óptimas condiciones y llene todas las especificaciones indicadas por el fabricante. La reproducibilidad de las lecturas de la misma solución deben ser $\pm 1.0\%$ (máximo). El uso de integradores, el estroncio interno de referencia y amortiguadores, pueden ayudar a lograr una mayor precisión.

7.3. Instrumento y ajuste eléctrico. Prepare el espectrofotómetro de absorción atómica para operarlo de acuerdo a las instrucciones provistas por el manual. Colocar la lámpara de calcio de cátodo hueco en el lugar en que va ésta. Prenda el aparato en "on". Seleccione la óptima corriente para la lámpara y permita que se caliente la lámpara para su estabilidad.

Ajustar la hendidura del monocromador y el selector de la longitud de onda para la línea de resonancia del calcio a 422.7 nm, ajustando la máxima energía del instrumento puesto entre 420 y 425 nm. Ajustar el voltaje del fotomultiplicador para dar salida óptima de corriente con un mínimo de corriente oscura. El ajustar la longitud de onda al pico real de línea de emisión verdadera de la lámpara mejora la respuesta de sensibilidad y estabilidad de los instrumentos de un rayo simple.

7.4. Condición de la flama.- Abrir las válvulas del tanque de aire acetileno. Ajustar los reguladores secundarios como recomienda el fabricante. Checar el quemador para estar seguros de que la cámara de premezclado y el nebulizador estén

limpios y libres de cualquier obstrucción extraña. Insertar una cabeza del quemador de aire acetileno sobre el mechero. Encender y ajustar el flujo de aire acetileno a la velocidad recomendada para el aparato. Para estabilizar la temperatura del quemador, aspirar agua hacia la flama cuando menos 10 minutos antes de proceder al siguiente paso.

(Nota: Una flama rica en acetileno da la máxima sensibilidad para la medición de calcio; sin embargo, puede ser difícil la precisión especificada en este método con una flama rica en combustible).

7.5. Determinación de la estabilidad, linealidad y reproducibilidad del método analítico. Este proceso debe ser repetido antes de analizar cada grupo de problemas.

7.51. Ajustar el instrumento a cero con agua.

7.52. Nebulizar la solución de 2.00 mmol/l de Ca y poner el instrumento para leer en unidades en escala extendida.

7.53. Ajustar la escala del sistema de lectura hasta -- que esta sea mayor de 1.000. Se requiere una expansión de escala de aproximadamente cinco para la mayoría de los instrumentos.

7.54. Reajustar el instrumento a cero con agua.

7.55. Para probar la estabilidad del instrumento, repita en secuencia el blanco y la solución estándar de 2.00 mmol/l de Ca, hasta que las lecturas repitan entre $\pm 1.0\%$, expresado

como desviación estándar relativa basado en un mínimo de 10 -- lecturas.

7.56. Nebulizar el blanco reactivo, las soluciones estándares de Ca de 2.00, 2.50 y 3.00 mmol/l y anotar sus lecturas. Nebulizar agua entre cada una de las soluciones estándar--res. Esta secuencia se repite 10 veces.

7.57. Probar la linealidad como sigue:

7.571. Ordenar las 10 lecturas obtenidas en el paso --- 7.56 para la solución estándar de 2.00 mmol/l de Ca de la me--nor a la mayor.

7.572. Ordenar las 10 lecturas obtenidas en el paso -- 7.56 para la solución estándar de Ca de 3.00 mmol/l de la me--nor a la mayor.

7.573. Tomar el segundo valor bajo obtenido en 7.571 y el segundo valor bajo obtenido en 7.572. Calcular su promedio. Llamar a este valor "L".

7.574. Tomar el segundo valor más alto obtenido en el paso 7.571 y el segundo valor más alto obtenido en 7.572. Calcular su promedio. Llamar a este valor "U".

7.575. Calcular el promedio de las 10 obtenidas en el paso para la solución estándar de 2.50 mmol/l de Ca. Llamar a este valor promedio "M".

7.576. Si el valor "M" cae entre los valores "L" y "U" puede concluirse que no hay no-linearidad aparente.

(Nota: Para valores distribuidos normalmente, el nivel de confianza es alrededor de 99%, por ejemplo, si los resultados de los tres estándares están en realidad en línea recta, la probabilidad de que "M" caiga fuera ("L", "U") es solamente de alrededor del 1%. De aquí, que esta regla no detecte pequeñas variaciones de linealidad. (Usando el tercer valor más bajo y alto permitirá mejor detección de no-linearidad, pero también descenderá el nivel de confianza alrededor de 88%).)

7.577. Si el valor "M" cae fuera de los valores "L" y "U", entonces hay evidencia de no-linearidad.

7.58. Si hay evidencia de no-linearidad, prepare soluciones estándares de calcio de 2.25 y 2.75 mmol/l de calcio, siguiendo los procedimientos dados anteriormente debidamente modificados. Checar la linealidad entre 2.00 y 2.50 mmol/l de Ca y entre 2.50 y 3.00 mmol/l de Ca siguiendo las modificaciones apropiadas trazadas en los pasos de la sección 7.57. Si la linealidad entre los estándares de 2.00 y 2.50 y también entre 2.50 y 3.00 mmol/l de Ca, aún no se obtiene, concluir que la respuesta del sistema instrumental no es lineal y que este método de referencia no es aplicable. Consultar con el fabricante para encontrar y corregir la fuente (s) de no-linearidad.

7.59. Teniendo probada y asegurada la estabilidad, reproducibilidad y linealidad, obtener los valores para cada --

una de las soluciones estándares de Ca. Restar la lectura pro medio para el blanco reactivo de el promedio obtenido para cada una de las soluciones estándares. Etiquetar los frascos en conformidad.

7.6. Determinación de la concentración del problema. - Anotar 10 lecturas de la solución problema como sigue:

7.61. Nebulizar la solución problema y en seguida nebulizar las dos soluciones estándares que están cerca de el valor de la muestra problema. Anotar estas lecturas.

7.62. Repetir esta secuencia de estándares y una sola muestra hasta obtener 10 mediciones válidas (7.7, abajo).

7.63. Repetir los pasos 7.61 y 7.62 en problemas adicionales y sus soluciones estándares asociados.

7.7. Medición válida. Para obtener una medición válida, seguir la secuencia de estándares y problemas y anotar los datos como muestra la tabla 1. Una medición de el problema consiste de la medida de cada uno de los estándares seguida por el problema y luego por repetición de cada uno de los grupos de estándares. La medida del problema es válida cuando las lecturas consecutivas de cada uno de los mismos estándares difieren por menos del 1%. Un ejemplo de este proceso se ilustra en la tabla 1.

8.0. CALCULOS.

8.1. Calcular la concentración de la muestra, basada -

en 10 mediciones válidas, como sigue:

$$C = S1 + \frac{(A_x - A_{S1})}{(A_{S2} - A_{S1})} (S2 - S1)$$

donde:

C = concentración de la muestra, mmol/l de Ca, para --
cada medición válida,

S1 = concentración del estándar más bajo, mmol/l de Ca,

S2 = concentración del estándar más alto, mmol/l de Ca,

A_x = lectura promedio del problema,

A_{S1} = lectura promedio del estándar más bajo, y

A_{S2} = lectura promedio del estándar más alto.

8.2. Recopilar las concentraciones obtenidas para 10-
mediciones válidas y determinar el valor promedio. Calcular -
la desviación estándar, la desviación estándar relativa, y el
error estándar.

9.0. PRECISION Y EXACTITUD.

9.1. Los resultados obtenidos en este método mostra--
ron un escaso bias negativo (ciertamente menor al 0.5%) cuan-
do lo comparamos contra el método espectrométrico de dilución
isotópica de masas. (5). Los primeros ejercicios de éste estu-
dio indicaron que este bias es insignificante cuando se compa-
ró con los grandes errores casuales encontrados entre labora-
torios. Aún cuando se usa el método de referencia y se sigan

las instrucciones exactamente.

9.2. Este método de referencia es válido para la determinación de calcio total en suero o en soluciones que contienen cantidades fisiológicas de sodio y potasio, o ambas. Cuando el análisis sigue el procedimiento exactamente como se ha descrito y el instrumental está en óptimas condiciones, el método de referencia producirá resultados para la concentración de calcio entre $\pm 2\%$ de el valor real o absoluto en el rango de 1.5 a 3.00 mmol/l de calcio.

9.3. Inherente en el método de referencia están las condiciones y descubrimientos de Pybus y colaboradores (7). Esto es especialmente verdadero para interferencias y efectos de matriz. Desviaciones significativas de el método con respecto a estos factores puede llevar a errores sistemáticos sustanciales. Por el método de referencia pueden analizarse pools de sueros de bovino y humano, como también soluciones acuosas con concentraciones fisiológicas de sodio y potasio. El efecto de una dilución menor de 10:500 no ha sido probada, aunque algún trabajo adicional (9) indica que puede ser tolerado el aumento de dilución y el uso de alícuotas de 5 ml de muestra en una dilución idéntica.

9.4. Es cierto que si se buscan resultados exactos y precisos las pruebas deben ser ejecutadas por analistas experimentados. Además, el analista debe estar completamente familia

rizado con el espectrofotómetro que él use. El aparato debe -- operarse en excelentes condiciones especialmente con respecto a su estabilidad y reproducibilidad.

REFERENCIAS

- (1) Copeland, B. E., Skendzel, L. P., and Barnett, R. N., --- Interlaboratory Comparison of University Hospital Referee Laboratories and Community Hospital Laboratories, Using - Results of the 1968 College of American Pathologists Clinical Chemistry Survey, *Am. J. Clin. Path.* 58, pp. 281- - 296 (1972).
- (2) IUPAC Commission on Atomic Weight, "Atomic Weights of the Elements 1973, "Pure Appl. Chem. 37, pp. 591-603. (1974)
- (3) IUPAC Commission on Units and Quantities and IFCC Committee on Standards, "Quantities and Units in Clinical Chemistry Recommendation 1973", *Pure Appl. Chem.* 37, pp. 525-546 (1974)
- (4) Cali, J. P., Problems of Standardization in Clinical Chemistry, "Bull. WHO 48, pp. 721-726 (1973)
- (5) Cali, J. P., Mandel, J., Moore, L., and Young, D. S. "A - Referee Method for the Determination of Calcium in Serum", *NBS Spec. Publ.* 260-36, COM7250527, NTIS, Springfield, Va. 22151.
- (6) Cali, J. P., Bowers, G. N., Jr. and Young, D. S., "A Referee Method for the Determination of Total Calcium in Serum", *Clin. Chem.* 19, pp. 1208-13 (1973).
- (7) Pybus, J., Feldman, F. J., and Bowers, G. N., Jr. "Measurement of Total Calcium in Serum by Atomic Absorption --- Spectrometry, with Use of a Strontium Internal Reference", *Clin. Chem.* 16, pp. 998-1007 (1970)
- (8) Moore, L. J., and Machlan, L. A., "High Accuracy Determination of Calcium in Blood Serum by Isotope Dilution-Mass Spectrometry", *Anal. Chem.* 44, pp. 2291-2296 (1972).

- (9) Pickup, J. F., Jackson, M. J., Price, E. M., and Brown, - S. S., "Assessment of the Reference Method for Determination of Total Calcium in Serum", Clin. Chem. 20, pp. 1324-30 (1974)
- (10) Hughes, J. C., Testing of Glass Volumetric Apparatus, NBS Circ. 602, US Government Printing Office, Washington, D.C. 20402 (1959)

TABLA 1
EJEMPLO DE MEDICION VALIDA

		Ca. mmol/litro					
Prueba No.		2.00	2.25	2.50	"X"	2.75	3.00
1	Estándares		1.222	1.355		1.486	1.608
2	Desconocido (1a. lectura)				1.477		
3	Estándares			1.354		1.480	
4	Desconocido (2a. lectura)				1.475		
5	Estándares			1.351		1.488	
6	Desconocido (3a. lectura)				1.420		
7	Estándares			1.320		1.475	

Lectura típica

En el ejemplo precedente, se obtuvieron dos mediciones válidas de el desconocido en la prueba 2 y 4 ya que la diferencia entre las lecturas de los estándares consecutivos es menor del 1%. Tal vez, la medición obtenida en la prueba 6 no es válida debido a que la diferencia entre 1.351 y 1.320 es mayor al 1%. Es decir,

$$1.355 - 1.354 = 0.001 \text{ o } < 0.1\%$$

$$1.486 - 1.480 = 0.006 \text{ o } 0.4\%$$

$$1.354 - 1.351 = 0.003 \text{ o } 0.2\%$$

$$1.488 - 1.480 = 0.008 \text{ o } 0.5\%$$

$$1.351 - 1.320 = 0.031 \text{ o } 2.3\%$$

XI - BIBLIOGRAFIA

- 1.- GUYTON CA: Tratado de Fisiología Médica. 4a ed. Interamericana p 980-995 (1971).
- 2.- LYNCH, RAPHAEL, MELLOR, SPARE, INWOOD; Métodos de Laboratorio 2a ed. Interamericana p 360-374 (1972).
- 3.- DAVIDSOHN I, HENRY JB: Diagnóstico Clínico por el Laboratorio. 5a ed. Salvat p 558-565 (1972).
- 4.- CANNON DC, WINKELMAN JW: Clinical Chemistry Principles and Technics. 2a ed. Bio-Science Laboratories p 646-670 (1974)
- 5.- HARPER HA: Manual de Química Fisiológica. 4a ed. El Manual Moderno S.A. p 454-456 (1975).
- 6.- CHOPPIN Gr, JAFFE B: Química. 1a ed Publicaciones Cultural S.A. p 476 (1967).
- 7.- HOWARD J y THOMAS Jr. W.C.: Clinical disorders of calcium-homeostasis. Med 42: 24, 1963.
- 8.- BURMAN KD: Ionized and total serum calcium an parathyroid -- hormone in hyperthyroidism. Ann Intern Med 84: (6); 668,-1976.
- 9.- MORIN LD: Direct colorimetric determination of serum calcium with o-cresolphthalein complexon. Am J Clin Pathol 61: 114, 1974.
- 10.- CONNERTY H y BRIGGS A,: Determination of serum by means of orthocresolphthalein@complexon. Am J Clin Pathol 45: 290,-1966.
- 11.- GLINDLER E y KING J,: Rapid Colorimetric determination of calcium in biologic fluids with methylthymol blue. Am J -- Clin Pathol 58: 376, 1976.
- 12.- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS: Reference method for total calcium in serum. 1976.
- 13.- NATIONAL BUREU OF STANDARDS:Certificate of Analysis Standard Reference Material 915.
- 14.- ZETTNER A y SELIGSON D,: Aplicattion of atomic absorpction spectrophotometry in the determination of calcium in serum. Clin Chem 10: (10): 869, 1964.

- 15.- BARNETT, R. y YODEN, W.J.: A revised scheme for the comparison of quantitative methods. Amer J Clin Pathol 54:-454. 1970.
- 16.- SNEDECOR N.G. y COCHRAN G.W.: Métodos Estadísticos. 4a -ed. Continental p 340 (1977).