

CARTAS A LA REDACCION

Cuantificación de factores de coagulación mediante enzimoimmunoanálisis

V.J. León Moya^a, A. López Borrasca

^a Servicio de Hematología, Hospital Clínico Universitario, Complejo Hospitalario de Salamanca, Salamanca, España.

La cuantificación inmunológica de los factores de la coagulación se efectúa habitualmente mediante electroinmunodifusión, recientemente se han comenzado a utilizar otras técnicas inmunoquímicas, como el inmunoenzimoinmunoanálisis, EIA, para cuantificar algunas de las proteínas que intervienen en los procesos de coagulación⁽¹⁾.

El EIA, es una técnica de fácil montaje y desarrollo, que permite procesar simultáneamente un gran número de muestras teniendo además un límite de detección superior a la electroinmunodifusión. El mayor inconveniente práctico del EIA, para su aplicación a proteínas de la coagulación en la práctica habitual, es la escasez de antisueños comerciales de calidad suficiente para su aplicación a la problemática que nos ocupa, así como la laboriosa obtención de los mismos en el laboratorio.

A fin de superar los obstáculos antes mencionados, hemos adaptado una variante de EIA (EIA indirecto por competición de antígeno) que nos permite la cuantificación de un buen número de factores de coagulación, requiriendo antisueños y otros reactivos fácilmente asequibles.

Como fuente de antígeno empleamos un concentrado comercial de factor IX, en el que se detectó la presencia y cantidad suficiente de los antígenos que deseábamos cuantificar, factores VII, VIII, IX, X, II, XII-A y XIII-s, y Protrombina⁽²⁾. Los antisueños contra estos factores y el anti IgG de conejo marcado con peroxidasa fueron suministrados por Behring (Behringwerke, Alemania Federal). Los patrones fueron elaborados a partir de una mez-

cla de plasmas, efectuando las diluciones requeridas por el método con suero fetal bovino, al que se le suprimió la actividad del complemento calentándolo a 65°C durante 30 minutos, Flow (Hamdem, Co, USA), de la misma procedencia fueron las placas de microtitulación Limbro. El suero fetal fue previamente probado para descartar la posible interferencia de factores de coagulación bovinos.

El tampón de fijación del antígeno a la placa empleado es el carbonato-hidrogenocarbonato 50 mmol/L pH=9,6. En el lavado de las placas se empleó un tampón compuesto de 0,15 mol/L de NaCl y 10 mmol/L de fosfato, pH=7,6, conteniendo 10 g/L de Tween 20. Para la reacción de la peroxidasa se empleó tampón citrato-fosfato 50 mmol/L pH=5 conteniendo como cromógeno O-fenilendiamina, Sigma (St. Louis, Mo, USA), cada 1g/L.

La fijación del antígeno a la placa se efectuó depositando en cada pocillo 200 µL de una solución de 10 mg/L de concentrado de factor IX en tampón de fijación, incubándose a continuación las placas 18 horas a 4°C, las placas conteniendo el antígeno fijado, previo lavado se conservaron congeladas a -20°C, repitiéndose el lavado al descongelarse para su utilización.

La detección inmunoquímica de los factores se inicia depositando en cada pocillo 100 µL de los plasmas problemas y patrones, depositándose a continuación 100 µL de una dilución del antisuero, cuyo factor deseamos cuantificar, diluido al 1/50 en suero fetal bovino. Procediéndose a una incubación de 1 hora a 37°C, transcurrido este tiempo, se lavan las placas y se procede a depositar en los pocillos 200 µL del antisuero anti IgG de conejo marcado con peroxidasa, diluido al 1/1000 en suero fetal, incubándose otra hora a 37°C, lavándose las placas finalizada esta segunda incubación. Finalmente se depositan 200 µL de solución cromogénica, preparada en el momento, incubándose a temperatura ambiente durante 30 minutos, transcurridos éstos, se procede a frenar la reacción añadiendo 50 µL de ácido sulfúrico 0,1 mol/L. La lectura de las placas se efectúa en un lector Multiscan Flow a 492 nm.

La cuantificación del factor en los problemas, se efectúa mediante interpolación de las absorbancias obtenidas sobre una curva patrón construida con los valores de los patrones, del factor a determinar, y sus correspondientes absorbancias.

Los coeficientes de variación intra e interserieles obtenidos para los 8 factores determinados fue menor al 5% con un porcentaje de recuperación superior al 95%.

Los plasmas testigos y los problemas fueron paralelamente analizados mediante electroinmunodifusión, obteniéndose un coeficiente de correlación superior a 0,86.

Esta técnica posibilita la determinación simultánea de 40 problemas duplicados ó 80 independientes por placa de un factor, asimismo la determinación conjunta de los 8 factores en 6 problemas. Con un límite de detección al menos 10 veces menor al de la electroinmunodifusión, un tiempo de ejecución de unas 3 horas frente a las 18 de la electroinmunodifusión, y un coste económico de aproximadamente la quinta parte.

Bibliografía

1. León VJ, León E, Hernández F, González R, López Borrasca A. Cuantificación del FVIII: AG mediante tres variantes de enzimoanálisis (ELISA indirecto, sandwich y CELIA) Sangre 1985; 30: 417-425.
2. Vicente V, Albercal, Calles M, Manso M, López Borrasca A. Coagulation proteins showing abnormal electrophoretic mobility in commercial concentrates of Factor VIII and Prothrombin complex Haemostasis 1984; 14: 453-459.

La concentración de transferrina en suero es preferible medirla por métodos inmunoquímicos

M.J. Merino Plaza

Departamento de análisis clínicos
Hospital de Bellvitge «Prínceps d'Espanya»
C/ Feixa Llarga s.n.
08907 L'Hospitalet de Llobregat (Barcelona)

El Comité Internacional para la Estandarización en Hematología (ICSH), en 1978 propuso un método de rutina (no de referencia) para la determinación de la concentración de transferrina por métodos indirectos, basado en la capacidad de fijación de hierro (III) del suero⁽¹⁾. En este método se satura el suero «in vitro» con un exceso de hierro (III). El exceso de hierro no fijado, se elimina del medio de reacción con carbonato de magnesio (II), que actúa como agente adsorbente. Después, se desproteíniza el sobrenadante y se acidifica el medio para liberar el hierro (III) unido a la transferrina. La medida del hierro (III) del sobrenadante (el sérico más el fijado «in vitro»), se hace por espectrometría óptica, reduciendo previamente el hierro (III) a hierro (II).

Existen numerosos métodos y equipos de reactivos similares al método citado.

Los principales inconvenientes de estos métodos basados en la capacidad fijadora de hierro (III) son^(2,3):

1.— La concentración y el pH de las soluciones de saturación deben estar muy controlados.

a) La concentración debe ser suficiente para saturar incluso los sueros de pacientes con anemia ferropénica importante.

b) el pH de estas soluciones es crítico: debe ser menor de 3 para evitar la precipitación de hidróxido de hierro (III), pero al adicionar la solución de saturación al suero, a veces se usan soluciones amortiguadoras alcalinas, ya que si la acidez resultante es muy elevada, se favorece la liberación de hierro (III) por parte de la transferrina en lugar de su saturación.

2.— La naturaleza y calidad de los agentes adsorbentes es importante. Según la calidad de los reactivos empleados, éstos son más o menos eficaces a la hora de eliminar el exceso de hierro (III) no fijado a la transferrina, lo cual es un importante factor de variabilidad analítica. Además, a veces, el carbonato de magnesio (II) empleado, también adsorbe una parte del hierro (III) fijado sobre la transferrina, por lo que se subestima la capacidad real de fijación de hierro (III) de la transferrina^(4,5).

3.— El tipo de espécimen y su concentración de transferrina también influyen en la calidad analítica.

En ciertas patologías, el suero aumenta su contenido en proteínas transportadoras de hierro (III) distintas de la transferrina, capaces de fijar hierro (III) «in vitro». Tal es el caso de las talasemias, hemocromatosis idiopática e histiocitosis maligna. Las características de fijación de hierro (III) «in vitro» para estas moléculas, no son las mismas que las de la transferrina⁽⁶⁾.

4.— El comportamiento de los sueros de control también introduce otra fuente de variabilidad, ya que los sueros de control liofilizados no presentan la misma cinética de fijación de hierro (III) que las muestras, sino que la fijación es mucho más lenta en los sueros de control liofilizados y reconstituídos.

5.— Otro inconveniente es que este tipo de métodos requieren muchos pasos, con lo que la precisión disminuye.

6.— Los cromógenos usados en la determinación final de hierro (III), confieren a estos métodos poca sensibilidad analítica y un límite de detección elevado, por lo que se necesita un volumen de suero mayor que el requerido con los métodos inmunoquímicos.

7.— Estos métodos no son fácilmente automatizables.

De lo expuesto hasta ahora se deduce que los métodos químicos de determinación de la transferrina, tienen algunos inconvenientes. Por ello, hay que tener en cuenta la posibilidad de utilizar métodos inmunoquímicos, ya que son más estandarizables y superan muchas de las limitaciones de los métodos antes descritos.

Existen distintos tipos de métodos inmunoquímicos para la determinación de la transferrina. Los más empleados son la inmunodifusión radial, la inmunonefelometría y la inmunoturbidimetría.

Los métodos de inmunodifusión radial son caros, no están automatizados y son muy lentos, ya que tarda varias horas en alcanzarse el equilibrio. La imprecisión es más elevada, puesto que la lectura depende de la objetividad del técnico al medir el diámetro del halo de precipitación.

Los métodos nefelométricos y turbidimétricos son automatizables y más rápidos y precisos que la inmunodifusión radial.

Los métodos nefelométricos tienen un límite de detección menor que los turbidimétricos, pero no en todos los laboratorios se dispone de un nefelómetro adecuado,

mientras que la turbidimetría se puede realizar en cualquier tipo de laboratorio en el que se disponga de un espectrómetro óptico.

Los métodos inmunoquímicos no son tan engorrosos como los químicos, no dependen tanto de las condiciones experimentales, y superan el inconveniente de los sueros de control antes citado, ya que aunque tengan una cinética de absorción del hierro (III) distinta a la de los especímenes, no varían sus propiedades antigénicas, pudiéndose procesar los controles igual que las muestras. Además, la imprecisión de los métodos inmunoquímicos es menor que la de los métodos de determinación indirectos basados en la capacidad fijadora de hierro (III) de la transferrina^(2,3).

De lo dicho anteriormente se deduce que la determinación química de la capacidad fijadora de hierro (III) del suero sólo refleja de un modo aproximado e imperfecto la capacidad real de fijación de hierro (III) de la transferrina, por lo que es importante tener en cuenta la posibilidad de hacer la determinación directa de la transferrina por métodos inmunoquímicos, ya que son fácilmente estandarizables, y más simples, exactos y precisos.

Bibliografía

1. International Committee for Standardization in Haematology. The measurement of total and unsaturated iron binding capacity in serum. *Br J Haematol* 1978; 38: 281-290.
2. Dezier JF. Capacité de fixation du fer par la sérum ou dosage immunochimique de la transferrine? *Ann Biol Clin* 1986; 44: 583-585.
3. Commission Fer et proteines de transport, Société Française de Biologie Clinique. Fait-il préférer le dosage immunochimique de la capacité de fixation du fer par le sérum? *Inf Sci Biol* 1985; 11: 334-346.
4. Fleck A. Path FR. Acute phase response: implications for nutrition and recovery. *Nutrition* 1988; 4: 109-117.
5. Miale JB. Hematología. Medicina de laboratorio. Barcelona: editorial Reverté, 1985.
6. Société Française de Biologie Clinique. Fer sérique, capacité de fixation du fer par le sérum, saturation de transferrine: données récentes, proposition de terminologie. *Ann Biol Clin* 1981; 39: 301-307.