

Determinación de fibrinógeno plasmático. Evaluación de tres métodos rápidos y valores normales en adultos de Costa Rica

Dr. Fernando Atmella* Dr. German F. Sáenz* Dr. Guido Arroyo*

INTRODUCCION

Para la determinación de fibrinógeno sanguíneo, se han aplicado con éxito variable (31), diferentes métodos de valoración de proteínas: gravimétricos, precipitación salina, electroforesis, refractometría, turbidometría, Kjeldahl, ultracentrifugación y colorimetría.

Los métodos que se emplean con más frecuencia en los laboratorios de análisis clínicos de nuestro país, son el de PARFENTJEV *et al.* (27) y el de FOWELL (9), en los que se logra la precipitación del fibrinógeno por medio de diferentes sales y se realiza lectura turbidométrica. Hemos podido constatar que las técnicas más frecuentemente usadas en otros países, son las que utilizan la precipitación del fibrinógeno plasmático como fibrina y analizan posteriormente el coágulo que se forma (7). La cantidad de fibrinógeno se puede medir con base en el peso exacto del coágulo, por determinación de la cantidad de nitrógeno (KJELDAHL) o utilizando métodos colorimétricos para la medición de las proteínas, como en las reacciones del biuret, Wu, de la ninhidrina o la de Folin-ciocalteu (31).

De los diferentes métodos que han sido señalados para la medición cuantitativa del fibrinógeno en el plasma, solamente unos pocos son adecuados para uso rutinario en el laboratorio clínico y ninguno de ellos es totalmente satisfactorio. Es interesante recalcar la enorme importancia que se ha dado a todas las proteínas plasmáticas, desde que se entendió y comprendió el significado biológico y fisiológico de las mismas; sin embargo con respecto al fibrinógeno, a despecho de la abundante literatura, esta no es una determinación rutinaria en los laboratorios de diagnóstico clínico. Indudablemente la mayoría de los métodos que se han preconizado son tediosos y complicados, poco reproducibles e inexactos, lo que tal vez sea el motivo para que no se haya impuesto como un análisis rutinario en el campo de la Química-Clínica.

* Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

En el método clásico para la determinación de fibrinógeno, introducido por CULLEN y VAN SLYKE (5), se agrega un exceso de calcio al plasma oxalata-do con lo que los iones de calcio y la tromboplastina ya existente en el plasma, convierten la protrombina en trombina, la que a su vez transforma el fibrinógeno en un coágulo de fibrina que precipita como sal insoluble de fibrina. Se separa este coágulo y se mide cuantitativamente con la técnica de investigación del nitrógeno del Kjeldahl. Este procedimiento y otros semejantes, tienen el inconveniente de que son métodos lentos, inadecuados para los laboratorios clínicos que requieren pruebas rutinarias y rápidas. Posteriormente aparecieron métodos (30, 39) en los que el plasma se trata con trombina para obtener un coágulo que, según el método, era tratado bajo diferentes circunstancias analíticas para medir la concentración indirecta del fibrinógeno plasmático.

El fibrinógeno es la proteína coagulable del plasma y el primer sustrato específico de la trombina. Por lo tanto es lógico esperar que los métodos más específicos para estimar la concentración de fibrinógeno en el plasma, sean aquellos en que se determina la cantidad de fibrina que se ha formado por la acción de la trombina (30). Sin embargo, se han hecho varias objeciones a los métodos que utilizan dicha enzima proteolítica específica para estos efectos. Por ejemplo, en pruebas como la del título de fibrinógeno, que es semicuantitativo o como la del tiempo de trombina, en ciertas circunstancias patológicas es posible que la prolongación del tiempo de coagulación más allá del plasma control, sea debida a la presencia de altos niveles de antitrombinas, de heparina o de sustancias circulantes semejantes a la heparina y no sólo a cambios cualitativos o cuantitativos del fibrinógeno (1). Asimismo es imposible evitar completamente la inclusión en el coágulo, de fibrina de otras proteínas extrañas al mismo (15). Otro factor a considerar es la lisis espontánea del coágulo de fibrina, que se puede producir a bastante velocidad, gracias a fenómenos enzimáticos, lo que añade una causa de error a la determinación (15).

En la formación de fibrina hay un factor llamado estabilizante de la misma (Laki-Lorand; XIII), que primero es activado por la trombina en presencia de iones de calcio (19). Este factor así activado, puede entonces ejercer su efecto polimerizante sobre la fibrina, con lo cual se obtiene un coágulo firme que es insoluble en ácido monocloroacético al 1 % (21). Es obvio que deficiencias marcadas de este factor XIII o ausencia total del mismo, pueden ser motivo de error en la determinación correcta del fibrinógeno a base de métodos que emplean trombina para recobrar un coágulo que va a ser medido por diferentes procedimientos (21).

En general, sin embargo, la mayoría de los autores considera que para la estimación de los niveles de fibrinógeno, es preferible medir cuánto del mismo coagula por trombina o calcio, que determinar su precipitación a base de sales, ya que al usar trombina para separar el fibrinógeno de otras proteínas plasmáticas, se obtiene una medida del fibrinógeno funcional; en cambio con los métodos que dependen de una precipitación química, ésta puede ser afectada en varios grados por los productos intermediarios de la fibrinolisis (2), aunque este fenómeno puede alterar pruebas como el tiempo de

trombina, por la presencia en el plasma de productos de fibrinógeno menos complejos, que pueden inhibir o falsar los resultados (3).

En muchos procedimientos de laboratorio se usan básicamente los métodos turbidométricos, para la mayoría de las determinaciones de fibrinógeno. Su única ventaja es la rapidez, ya que en cuanto a reproducir resultados y a la precisión de los mismos, comparan desfavorablemente con las técnicas que incluyen una separación del fibrinógeno antes de su medición. Se han propuesto muchos métodos basados en el análisis turbidométrico, como los de PARFENTJEV y su grupo (27), FOWELL (9), PODMORE (28, 37, 38) y el de MARTINEK y BERRY (23). En éstos el fibrinógeno se precipita por medio de sales inorgánicas y la turbiedad se compara con la producida por otras proteínas, por ejemplo, las de plasma completo, suero o gama globulina. Estos métodos demandan poco tiempo y son útiles para decidir si la proporción del fibrinógeno es normal o baja, pero pueden resultar equivocados en las zonas intermedias y especialmente en las muy bajas (7). Ello se debe, en parte, a las muchas fuentes de error del análisis nefelométrico en condiciones ordinarias (31). Desgraciadamente la información que proporcionan estos métodos rápidos, es la menos decisiva en los casos de valores bajos en la zona límite, a los que precisamente deben corresponder las decisiones médicas de mayor trascendencia (31).

El propósito del presente trabajo es, en primer lugar, hacer un análisis crítico de la metodología que se ha utilizado hasta el presente para la determinación del fibrinógeno plasmático, haciendo hincapié en la bondad de los métodos más usados en nuestro medio; asimismo preconizar un método, al que le hemos encontrado varias de las condiciones exigibles a todo procedimiento analítico para uso rutinario, como son rapidez, exactitud y posibilidad de reproducir resultados. En este sentido hemos adoptado el método de GOODWIN (11), el cual consideramos puede ser un método estándar para todos nuestros laboratorios. Y, por último, señalar la bondad del método anteriormente indicado al compararlo con el procedimiento turbidométrico a base de sulfato de amonio, de PARFENTJEV *et al.* (27), modificado por FOWELL (9) y con el nefelométrico de STIRLAND (36), que se basa en la propiedad única del fibrinógeno como proteína, de coagular a 56°C en soluciones neutras.

MATERIAL Y METODOS

Todos los especímenes de plasma requeridos para este trabajo, se obtuvieron de estudiantes universitarios de ambos sexos, cuyas edades estaban comprendidas entre 17 y 25 años.

Las muestras de sangre se anticoagularon de acuerdo con lo prescrito para cada una de las técnicas utilizadas y los plasmas se analizaron dentro de los primeros ocho días siguientes a su recolección, siendo preservados a 4°C tal y como se recomienda (7, 15, 23).

Ninguna muestra presentaba signos evidentes de hemoglobina, ictericia o lipemia. Asimismo se hizo un doble control de nuestros valores con patrones de fibrinógeno de la Casa Sigma, que se utilizaron fundamentalmente en el procedimiento de GOODWIN (12), al que nos referiremos más adelante.

Para las determinaciones cuantitativas de fibrinógeno se usaron tres métodos:

1) Método de precipitación selectiva por calor (56°C) de STIRLAND (36) ligeramente modificado por LYNCH *et al.* (22), en el cual se expresan los resultados en mg % al adoptar la estandarización de las unidades de turbidez de timol con sulfato de bario de SHANK y HOAGLAND, de acuerdo con LYNCH *et al.* (22).

Es preciso señalar, que el método de STIRLAND no da buenos resultados cuando se usan citratos. Es indiferente utilizar oxalatos, EDTA o heparina (11).

2) Método turbidométrico de PARFENTJEV *et al.* (27) a base de sulfato de amonio, ligeramente modificado por FOWELL (9), en el que se expresan los valores en mg %, al aplicar una fórmula o ecuación empírica, gracias a que contamos con un espectrofotómetro Colman Jr. modelo 6II A, tal y como lo enfatiza FOWELL (9).

Dicha ecuación es:

$$\frac{\text{D.O.} + 0,019 \times 1,000}{0,509} = \text{mg \%}$$

Para esta técnica se utilizó citrato de sodio al 3,8 % en proporción con la sangre 1:9, razón por la cual los resultados se multiplicaron por 1,1.

3) Métodos de GOODWIN (12), de aislamiento del fibrinógeno a base de sulfato de sodio y cuantificación ulterior por la reacción del biuret.

Tomando en consideración que este procedimiento es relativamente reciente, que es el que preconizamos para fibrinogenemia y que le hemos introducido algunas variantes, nos parece conveniente exponerlo en detalle:

1) Toma de la muestra: en tubos de centrifuga aforados se mezcla el anticoagulante de Wintrobe con la sangre, en proporción 1:9. El resultado es el producto de multiplicar los valores particulares por 1,1. No existe contraindicación para el uso de otros anticoagulantes conocidos (11).

Reactivos

A menos que se especifique lo contrario todas las sustancias químicas deben ser grado reactivo.

- 1) Na₂SO₄ 13 %, p/v
- 2) Reactivo cualitativo de Benedict (14)

Reactivo cualitativo de Benedict:

Con ayuda del calor se disuelven 173 g de citrato de sodio y 100 g de carbonato de sodio en 800 ml de agua. Se filtra con papel de filtro en un vaso graduado y se completa con agua hasta 850 ml.

Se disuelven 17,3 g de sulfato de cobre en 100 ml de agua; se vierte lentamente en un erlenmeyer de un litro, la solución de citrato-carbonato sobre la de sulfato de cobre, agitando constantemente. Se deja enfriar y luego se

afora hasta un litro. La solución así preparada se puede usar de inmediato y se conserva por largo tiempo.

Solución de urea al 30 %, p/v

NaCl 0,85 %, p/v

Acido cítrico ($H_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$) 10 %, p/v

Hipoclorito de sodio (NaOCl) 5 %, p/v

NaOH 3 %, p/v, libre de carbonato, que se prepara con agua doblemente destilada en vidrio. Se debe descartar cualquier sedimento que se observe en este reactivo.

Biuret modificado: Se mezclan 50 ml de hidróxido de sodio al 3 % con 5 ml de reactivo cualitativo de Benedict (o proporciones equivalentes). Este reactivo no es estable y se debe preparar diariamente antes de usarlo.

Solución "stock" estándar de proteína al 1 %, p/v. Para estos efectos se pueden utilizar las soluciones controles tipo Lab-trol (Dade) o patrones proteicos de la Casa Sigma.

Soluciones diluidas del estándar de proteínas: Con una pipeta se colocan 1,0 - 2,0 - 4,0 y 8,0 de la solución estándar "stock" de proteína en frascos volumétricos de 10 ml, se diluye con NaCl 0,85 % hasta el borde y se mezcla bien. Mientras no se usan, estas soluciones se deben mantener en refrigeración. Sin embargo no son estables y deben ser descartadas después de 30 días.

PROCEDIMIENTOS

Microtécnica (de acuerdo al concepto analítico de NATELSON (25))

Con una pipeta se colocan 0,2 ml de plasma no icterico en un tubo 13 x 100 mm, se añade 3,8 ml de la solución de sulfito de sodio, se mezcla bien y se pone en baño María a 37°C por 10 minutos.

Se ponen los tubos en una centrífuga a 2.500—3.000 rpm por 5 - 10 minutos y se decanta todo el sobrenadante por inversión. Se lava el precipitado así obtenido con 4 ml de la misma solución de sulfito de sodio y se utiliza un mezclador vortex o la agitación manual para romper el sedimento y homogeneizar.

Se coloca nuevamente en una centrífuga a 2.500 - 3.000 rpm durante 10 minutos. Se elimina cuidadosamente todo el sobrenadante. Se agrega 0,5 ml de solución de urea y se mezcla bien hasta lograr que desaparezca completamente la turbiedad. Se añaden luego 3 ml del reactivo modificado del biuret, se mezcla y se dejan en reposo los tubos a temperatura ambiente por 15 minutos para el desarrollo de color. Finalmente se lee en el espectrofotómetro a 540 m μ , contra un blanco en que se mezclan 3 ml del biuret y 0,7 ml de la solución de urea.

Calibración (Microtécnica)

Para la curva de calibración utilizamos un patrón de proteínas de 7,00 g % de la Casa Dade (Lab-trol), así como un patrón de fibrinógeno de la Casa Sigma con un 63 % de proteína. Con ambas soluciones proteicas obtuvimos excelentes calibraciones, entre las que hubo además una estrecha correlación.

Con 2,5 volúmenes de Lab-trol y 15 volúmenes de solución salina, se prepara la solución "stock" estándar de proteína al 1 % (1 g/100 ml).

La curva de calibración se diseñó añadiendo en los respectivos tubos, alícuotas de 0,2 ml de las soluciones diluidas (que representan 100, 200, 400 y 800 mg de proteína por 100 ml de muestra) en los respectivos tubos, más 0,5 de solución de urea y luego 3 ml del reactivo del biuret, dejando todo en reposo por 15 minutos y efectuando las lecturas respectivas contra un blanco, en la misma forma que se indicó en el micro procedimiento.

Macrotécnica (especialmente indicada para plasma icterico)

Con una pipeta se colocan 0,5 ml de plasma y 0,5 ml de solución en un tubo 15 x 125 ml, se agregan 9 ml de la solución de sulfito de sodio y se incuba por 10 minutos a 37°C. Se pone la mezcla en una centrífuga a 2.500 - 3.000 rpm durante 5 - 10 minutos. Se decanta todo el sobrenadante y se lava el precipitado con 9 ml de la solución de sulfito. Se vuelve a colocar en la centrífuga y se elimina el sobrenadante y se deja el tubo invertido sobre un papel de filtro por unos 2 - 3 minutos. A continuación se añaden 0,5 ml de la solución de urea y se mezcla bien para disolver el precipitado. Se adicionan 0,5 ml de ácido cítrico al 10 % y se mezcla; luego 0,5 ml de solución de hipoclorito de sodio al 5 % y se mezcla. (Tanto el hipoclorito como el ácido cítrico no son indispensables si se trata de plasmas no ictericos; en estos casos la diferencia de volumen se puede compensar agregando 1 ml de agua destilada).

Finalmente se mezcla con 5 ml de NaOH al 3 %, seguido de 1 ml del reactivo cualitativo de Benedict, se añaden 5,0 ml de agua destilada, se deja en reposo por 15 minutos y se mide el color resultante a 540 m μ , contra un blanco preparado a partir de 0,5 ml de agua destilada y los otros reactivos en la cantidad y concentración antes mencionada.

Calibración (Macrotécnica)

Para la calibración se añaden alícuotas de 0,5 ml de las soluciones estándares de proteínas, más 0,5 ml de urea, 0,5 ml de ácido cítrico, 0,5 ml de hipoclorito, 5 ml de hidróxido de sodio y 1 ml del reactivo de Benedict. Se deja en reposo por 15 minutos y se lee contra un blanco tal y como se especificó en el macroprocedimiento.

RESULTADOS

Las mediciones fotométricas para este trabajo, se hicieron en un espectrofotómetro B&L, en los métodos de STIRLAND (36) y GOODWIN (11); y en un Coleman Junior modelo 6A, para el procedimiento de FOWELL (9).

En el Cuadro 1 se expresan los resultados numéricos y estadísticos, obtenidos con los tres métodos en referencia. Para todos ellos se aplicó un percentil aproximado de 2,5 %.

CUADRO 1

Valores de fibrinógeno (mg %)

Método	No. de muestras	Promedio	Desviación estándar	Valores margen
Goodwin	255	422	76,5	273 — 586
Fowell	75	235	59	120 — 372
Stirland	252	187	58	106 — 326

En el estudio comparativo de los métodos de GOODWIN y FOWELL, y GOODWIN y STIRLAND, es posible apreciar con mayor objetividad, diferencias marcadas con los valores de fibrinógeno determinados por procedimientos que tienen una base analítica totalmente diferente. En el Cuadro 2 se indican tales comparaciones, aunque es preciso aclarar que la estimación de los valores margen es poco precisa porque el número de muestras es relativamente pequeño ($N=25$).

CUADRO 2

Valores comparativos de fibrinógeno (mg %)

	Diferencia promedio	Desviación estándar	Valores margen de las diferencias
Goodwin/Fowell	159	61	33 — 285
Goodwin/Stirland	227	49	125 — 328

DISCUSION

La cuantificación del fibrinógeno, uno de los tantos componentes del plasma sanguíneo, ofrece varias dificultades técnicas, pues para su separación se tropieza con muchos de los problemas que se presentan en el análisis de globulinas. Si se utilizan procedimientos de coagulación, es posible que durante ésta, queden incluidas en parte las otras fracciones proteicas y si se recurre a métodos de precipitación, no sólo es factible que se incluyan otras proteínas, sino también, que la precipitación sea incompleta. Puesto que es sabido que las fracciones proteicas varían ampliamente en múltiples trastornos patológicos, no se ha intentado introducir ninguna corrección al respecto, pues un solo factor no bastaría para satisfacer todas las posibilidades (31).

Las diferencias en las condiciones durante la coagulación o precipitación del fibrinógeno, así como el método de análisis in extenso, explican en gran parte la variedad en cuanto a valores normales que se halla en la bibliografía. En consecuencia, es conveniente establecer delimitaciones de los valores normales, sobre todo al aceptarse un método analítico que sea lo más preciso posible.

El reporte de los resultados obtenidos con los procedimientos convencionales de laboratorio, para la determinación cuantitativa del fibrinógeno plasmático, generalmente requiere horas y en ocasiones puede sufrir todavía mayores retrasos, lo que hace que tales procedimientos resulten inadecuados en situaciones de emergencia, ya que en los estados hemorrágicos de instalación brusca, producidos por disminución del fibrinógeno plasmático, la cuantificación rápida y exacta de esta proteína es de enorme importancia para poder establecer en corto tiempo el diagnóstico y la terapéutica adecuados (8, 31, 32, 33, 35).

La mayoría de los muchos procedimientos prolongados y laboriosos que se han propuesto para la determinación del fibrinógeno plasmático, comprenden dos etapas: Primero se aísla el fibrinógeno de otras proteínas plasmáticas y luego se efectúa la cuantificación física o química de la proteína así obtenida. La separación del fibrinógeno de las otras proteínas plasmáticas, se puede llevar a cabo por su interacción con la trombina y/o el calcio para formar fibrina, por su coagulación a bajas temperaturas o por su característica baja solubilidad con diferentes sales y alcoholes (11). Otros reportes técnicos incluyen la interacción de esta proteína con protamina (11) y con antifibrinógeno (3, 6).

Las técnicas para la cuantificación de fibrinógeno incluyen, entre otras, la de pesada, la estimación del contenido de nitrógeno, la determinación colorimétrica por la reacción del biuret, de la ninhidrina, de los fenoles y por la absorción ultravioleta de la fibrina disuelta en una solución de urea al 40 % (11).

Se han propuesto varios métodos turbidométricos para la estimación del fibrinógeno. Estos métodos directos incluyen la precipitación con sulfato de amonio, cloruro de sodio, sulfito de sodio y también la polimerización del fibrinógeno por trombina y calcio (7), o solamente calcio (16). Existen además otros procedimientos que utilizan trombina para reacciones turbidométricas (17, 32) y alcohol-trombina (39).

Las técnicas de aislamiento del fibrinógeno usando trombina, son de las más tediosas y que consumen más tiempo; sin embargo, algunos autores consideran que este procedimiento es el más exacto por cuanto lo que se mide es fibrinógeno fisiológicamente activo (20, 30).

Con respecto a los procedimientos en que se logra la separación del fibrinógeno plasmático, por precipitación con diversas sales para la medición fotométrica de la turbiedad, conviene señalar las ventajas y desventajas de dichos métodos. La turbidez provocada por el sulfato de amonio (7, 31), es una técnica rápida y fácil de realizar, pero es más que nada un método semi-cuantitativo. Por ejemplo, con este procedimiento es imposible medir con precisión niveles bajo los 90 miligramos % (7), lo que nosotros hemos corroborado.

La coagulación es la característica específica del fibrinógeno, por lo que aparentemente, los métodos de análisis del mismo que dependen de su conversión en fibrina, deben ser más fisiológicos y específicos que los procedimientos que se fundamentan en la precipitación salina del fibrinógeno como tal (15). Esta evidente ventaja sin embargo está contrarrestada entre otras cosas, por el hecho de que no se puede evitar completamente la inclusión en el

coágulo de fibrina de otras proteínas y la lisis espontánea del coágulo de fibrina (15), circunstancias que provocan error en este tipo de determinación, pero no en los procedimientos de fraccionamiento salino o turbidométricos. Parece ser que, cuando menos algunos de los métodos turbidométricos directos son en general menos sensibles que los procedimientos de aislamiento y cuantificación posterior y están sujetos a un alto grado de interferencia por parte de constituyentes plasmáticos normales y anormales (11).

MARTINEK y BERRY (23) al comparar su método, basado en la precipitación cuantitativa del fibrinógeno plasmático por medio de un bófer de fosfatos, con el de PARFENTJEV *et al.* (27), encuentran que en cuanto a sensibilidad su método es mejor, permite un control del pH de la mezcla de reacción del reactivo para fibrinógeno, el cual en realidad es un verdadero bófer, no requiere un control de temperatura ambiental y los resultados de la turbiedad con las muestras de plasma siguen más íntimamente la ley de BEER. Además la turbiedad resultante es más estable que cuando se precipita el fibrinógeno con sulfato de amonio. Los mismos autores consideran que la prueba de turbiedad por medio de las sales de fosfato, es tan exacta y precisa como el método de REINER y CHEUNG (31), el cual es más elaborado y consume más tiempo. No obstante los autores reconocen que este último procedimiento es un excelente método de referencia. Uno de nosotros (34) ha tenido una buena experiencia, con los métodos a base de sales de fosfatos para la medición de proteínas fraccionadas del suero, lo que nos lleva a creer que el método de MARTINEK y BERRY debe ser adecuado y cuantitativo para fibrinógeno.

Después de una exhaustiva revisión de la literatura y en atención a los procedimientos que se usan en nuestro medio, nos propusimos hacer un estudio de tres métodos para fibrinógeno plasmático. En vista de que tomamos como referencia la técnica de aislamiento y colorimetría de GOODWIN (12), creemos oportuno mencionar, previamente a cualquier discusión sobre nuestros hallazgos, las consideraciones críticas que sobre el tema nos ofrece el autor mencionado y que nosotros hemos corroborado.

Los métodos turbidométricos comparados por GOODWIN (13), fueron su técnica a base de sulfito de sodio, la modificación de FOWELL (9) al método del sulfato de amonio de PARFENTJEV *et al.* (27) que emplea una solución de sal al 13,33 %, el procedimiento de PODMORE (28) que utiliza sulfato de sodio al 10,5 % y el ya citado método de MARTINEK y BERRY (13), a base de sales de fosfato al 1,20 molar, con concentraciones equimoleculares de fosfato ácido de potasio y fosfato disódico.

El fibrinógeno fraccionado por cada uno de los agentes precipitantes utilizados, fue disuelto en solución de urea, luego se agregó hidróxido de sodio y reactivo cualitativo de BENEDICT para el desarrollo de color. Hubo gran correlación entre la cantidad de fibrinógeno plasmático por sulfito y fosfatos, a diferencia de lo obtenido con las otras dos sales. En la experiencia del autor, el grado de turbiedad producido por fraccionamiento salino, no es un índice confiable respecto a la cantidad de fibrinógeno presente. Por lo tanto, la medida de la concentración de fibrinógeno por turbiedad, a base de los diferentes agentes fraccionadores que se han preconizado, no parece ser suficientemente precisa para la medición cuantitativa de esta proteína.

Se demostró entonces claramente la bondad de los métodos de fracciona-

miento del fibrinógeno, al observar los valores obtenidos con el uso de fibrinógeno bovino para la estandarización en los procedimientos que se compararon. En la tabla que sigue se señalan los valores que obtuvo el autor.

Comparación de los valores de fibrinógeno obtenidos por técnicas de fraccionamiento salino (Goodwin 13).

Fibrinógeno bovino mg/100 ml	Fibrinógeno recobrado (mg %)			
	Na ₂ SO ₃	Fosfatos	NH ₄ (2)SO ₄	Na ₂ SO ₄
690	665	535	355	380
360	360	315	250	200
180	180	180	165	150

El procedimiento descrito por GOODWIN (12) y que nosotros hemos aplicado con ligeras modificaciones, es comparativamente sencillo y rápido. A diferencia de otros métodos, no presenta dificultad para el establecimiento de los patrones para comparación. Asimismo y a diferencia de otros métodos como los que emplean el reactivo para fenoles (20, 26, 30), no utiliza factores cromógenos para convertir los valores hallados en mg %, puesto que el reactivo del biuret determina enlaces peptídicos en lugar de un aminoácido concreto (31). En otras palabras, con este método se puede usar cualquier patrón proteínico, ya que la curva de calibración permite analizar cantidades equivalentes de fibrinógeno, de albúmina o de suero completo, en las proporciones establecidas para cada procedimiento (12), gracias a la técnica del biuret modificada, CAMPBELL y HANNA, de acuerdo con HENRY (15), no recomiendan en su método original a base de sulfito de sodio, la determinación cuantitativa del fibrinógeno con la reacción del biuret, ya que en esas condiciones se produce un enturbamiento que no se puede eliminar ni siquiera mediante la extracción con éter. Esta aparente e insoslayable dificultad, fue obviada por GOODWIN (12), cuando demostró que el fibrinógeno precipitado por sulfito es muy soluble en solución de urea al 40 %, hecho también comprobado por GANS y KRIVIT (10).

Es importante indicar que el sulfito de sodio tiende a precipitar la bilirrubina, lo que hace difícil removerla aun lavando el precipitado que se obtiene. La interferencia de tal pigmento por arriba de los 24 mg % es especialmente notoria en el microprocedimiento, que es el que hemos utilizado en este trabajo, en virtud de su reacción con el biuret (12). La interferencia debida a exceso de lípidos (más de 2.000 mg %), es fundamentalmente turbiedad.

Este problema se puede corregir parcialmente, al sustraer al suero problema el grado de turbiedad. La concentración de hemoglobina plasmática más allá de 150 mg %, provoca falsos valores de fibrinógeno por su reacción con el reactivo de biuret, que es dos veces más sensitivo que el biuret convencional (11).

Al concretar los resultados obtenidos, no nos queda sino concluir en que los valores de fibrinógeno responden por lo general al método que se ha se-

guido, por lo que no puede sorprender a nadie que recomendemos con entusiasmo el procedimiento de GOODWIN (12).

Los valores margen y medios de las muestras de hombres y mujeres, indican que no existen diferencias de los niveles de fibrinógeno plasmático, entre los sexos, hecho ampliamente aceptado por otros autores (11, 26, 30). Asimismo deseamos señalar una vez más la bondad del método de GOODWIN, citando otro trabajo (23) en que se comparó con éxito este método con otros que se aceptan como de referencia. En cuanto al método turbidométrico de STIRLAND (36) nos parece que como procedimiento turbidométrico que es, ya tiene implícitas todas las desventajas e inexactitudes propias de estos análisis; además, estará contraindicado en presencia de piroglobulinas (11) y aún en presencia de criofibrinógeno (15, 18).

Lo mismo podemos decir de la modificación de FOWELL (9) al método turbidométrico de PARFENTJEV *et al.* (27). Asimismo es preciso llamar la atención hacia el hecho de que algunos laboratorios aplican las fórmulas empíricas de PARFENTJEV o de FOWELL, usando fotómetros diferentes a los que sirvieron para la obtención de las ecuaciones, lo cual introduce un enorme error que invalida un método de por sí semicuantitativo (7). Conviene recordar, que con este método se reportan valores margen de fibrinógeno de 113 a 380 mg %, con valor medio de 246 mg % (5,27), los cuales se relacionan estrechamente con los encontrados por nosotros con el mismo procedimiento.

Por otra parte, al comparar los valores obtenidos en 25 muestras, se aprecian las diferencias básicas entre un procedimiento colorimétrico que aísla selectivamente al fibrinógeno, luego lo cuantifica por medio de una reacción de color universalmente conocida por su bondad y que utiliza un biuret modificado doblemente sensible (11), con dos métodos que se basan en medir el grado de turbiedad y que están por ello sujetos a importantes variables, debido a las muchas fuentes de error del análisis nefelométrico en condiciones ordinarias, tal y como lo señalan REINER y CHEUNG (31), autores de un método que se considera excelente referencia para análisis del fibrinógeno (23).

La inexactitud de los métodos de STIRLAND y FOWELL, se refleja en nuestras experiencias con el uso de soluciones patrón de fibrinógeno bovino y en las de otros autores (11, 13).

CUADRO 3

Valores de fibrinógeno (n=2)

Concentración de fibrinógeno en solución patrón (mg %)	Valores obtenidos con 3 diferentes métodos (mg %)		
	Goodwin	Stirland	Fowell
200	202	186	152
400	401	388	206

Estos resultados y los que se indican en el análisis estadístico, demuestran que ambos procedimientos turbidométricos no son más que métodos semicuantitativos, que podrían decidir si el fibrinógeno se halla en proporción muy

baja o muy alta, pero que pueden resultar equívocos en las zonas intermedias, con el agravante de que la información que proporcionan es menos definida en los casos de valores bajos en la zona límite (100 - 120 mg %), en los que precisamente hay que tomar las decisiones de mayor trascendencia médica (7, 31).

Se podría sospechar que con el método de GOODWIN (12) que nosotros preconizamos, existe el problema de que se incluyan otras proteínas en la fase de separación o aislamiento del fibrinógeno con la solución de sulfito de sodio, tal como lo supone MILLER (24), en vista de que los valores son ostensiblemente más altos que los obtenidos por métodos de precipitación o turbidométricos. Sin embargo, el autor (13), ha demostrado excelentes recuperaciones, factibilidad de reproducir resultados, exactitud y una estrecha correlación de sus hallazgos con los de métodos ampliamente aceptados, aunque no de uso rutinario, como el de interacción con trombina (11). Los valores de GOODWIN (12) con su microprocedimiento, que fue el que se utilizó en este trabajo, oscilaron entre 390 y 600 mg %, con un valor promedio de 484 mg %, cifras bastante semejantes a las nuestras: 273 a 586 mg %, con una media de 422 mg %, incluidos un 95 % de los casos aproximadamente.

RESUMEN

Se hacen determinaciones plasmáticas de fibrinógeno por los métodos de GOODWIN (12), FOWELL (9) y STIRLAND (36), en población universitaria de uno y otro sexo, con edades comprendidas entre 17 y 25 años.

Con el método de GOODWIN, ligeramente modificado, que es el que nos proponemos preconizar, se obtuvieron en un 95 % aproximadamente de los casos estudiados (n=255), valores de 273 — 586 mg %, con un valor promedio de 422 mg %. Se comparan los tres métodos en referencia y se señalan las diferencias tan evidentes entre los valores hallados.

Por último se hace un ligero análisis crítico de la mayoría de los diferentes métodos analíticos encontrados en la literatura.

BIBLIOGRAFIA

1. BAUER, J. D., PH. G. ACKERMANN & G. TORO
Bray's clinical laboratory methods. 7^a Ed., IX + 764 pp., C. V. Mosby, Saint Louis, U. S. A., 1968.
2. BURMESTER, H. B. C., K. AULTON & G. I. HORSFIELD
Evaluation of a rapid method for the determination of plasma fibrinogen. J. Clin. Path. 23: 43, 1970.
3. CASTELAN, D. J., J. HIRSH & M. MARTIN
Latex-bound antifibrinogen test for plasma fibrinogen assay. J. Clin. Path. 21: 538, 1968.
4. COLES, M. & W. ROMAN
A rapid method for estimating fibrinogen in plasma. J. Clin. Path. 10: 282, 1957.
5. CULLEN, G. E. & D. D. VAN SLYKE
Determination of the fibrin, globulin and albumin nitrogen of blood serum. J. Biol. Chem. 41: 587, 1920.

6. CHEN, TH. & C. H. LAI
Fibrinogen assay by an immunodiffusion plate. *Amer. J. of Clin. Path.* 52: 629, 1969.
7. ELLIS, B. C. & A. STRANSKY
A quick and accurate method for the determination of fibrinogen in plasma. *J. Lab. and Clin. Med.* 58: 477, 1961.
8. FANTL, P.
Hypofibrinogenaemia with a possible defective fibrinogen associated with fibrinolysis *Austral Ann. Med.* 18(1): 43, 1969.
9. FOWELL, A. H.
Turbidimetric method of fibrinogen assay. Results with the Coleman junior spectrophotometer *Amer. J. Clin. Path.* 25: 340, 1955.
10. GANS, H. & W. KRIVIT
Study of fibrinogen and plasminogen concentrations in rabbits during anaphylactic shock. *J. Lab. Clin. Méd.* 58: 259, 1961.
11. GOODWIN, J. F.
An evaluation of technics for the separation and estimation of plasma fibrinogen. *Clin. Chem.* 11(1): 63, 1965.
12. GOODWIN, J. F.
Microestimation of fibrinogen with a semimicro modification applicable to icteric plasma. *Clin. Chem.* 13(11): 947, 1967.
13. GOODWIN, J. F.
An evaluation of turbidimetric technics for estimation of plasma fibrinogen. *Clin. Chem.* 13(12): 1057, 1967.
14. HAWK, P. B., B. L. OSLER & W. H. SUMMERSON
Química fisiológica práctica. 1ª Ed., XV + 1269 pp., Edit. Interam. S. A., México, 1949.
15. HENRY, R. J.
Química Clínica. Principios y técnicas. Tomo I, Cap. 11, XIX + 658 pp., Edit. Jims, Barcelona, 1968.
16. INGRAM, G. I. C. & M. D. MATCHETT
A rapid "side-room" method for the determination of plasma fibrinogen concentration as fibrin. *J. Clin. Path.* 13: 469, 1960.
17. JACOX, R. E.
A new method for analysis of plasma fibrinogen utilizing a cationic detergent. *J. Lab. Clin. Med.* 44: 886, 1954.
18. KORST, D. R. & C. H. KRATOCHVIL
Cryofibrinogen in a case of lung neoplasia associated with thrombophlebitis migrans. *Blood* 10 (9): 945, 1955.
19. LAKI, K. & GLADNER, J. A.
Chemistry and physiology of the fibrinogen-fibrin transition. *Physiol. Reviews* 44: 127, 1964.
20. LANKFORD, P. B.
A quantitative method for measuring fibrinolytic activity in humans. *Am. J. Med. Tech.* May-June, pp. 225, 1965.

21. LORAND, L. & K. KONISHI
Activation of the fibrin stabilizing factor of plasma by thrombin. Arch. Biochem. y Biophys., 105: 58, 1964.
22. LYNCH, M. J., S. S. RAPHAEL, L. D. MELLOR, D. D. SPARE, F. HILLS & M. J. INWOOD
Métodos de laboratorio 1ª Ed., XV + 661 pp., Edt. Interam. S. A., México, 1965.
23. MARTINEK, R. G. & R. E. BERRY
Micromethod for the estimation of plasma fibrinogen. Clin. Chem. 11(1): 10, 1965.
24. MILLER, S. E.
A text book of Clinical Pathology, 7ª Ed., XVI + 999 pp. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1966.
25. NATHANSON, S.
Microtécnicas de química clínica. 1ª Ed. Española, XVI + 659 pp. Ediciones Toray, S. A., Barcelona, 1964.
26. OGSTON, C. M. & D. OGSTON
Plasma fibrinogen and plasminogen levels in health and in ischaemic heart disease. J. Clin. Path., 19: 352, 1966.
27. PARFENYJEV, I. A., M. L. JOHNSON & E. E. CLIFFTON
The determination of plasma fibrinogen by turbidity with ammonium sulfate. Arch. Biochem. 46: 470, 1953.
28. PODMORE, D. A.
Rapid turbidimetric methods for the determination of plasma fibrinogen. Clin. Chem. Acta 4: 242, 1959.
29. PRYCE, J. D.
Simplified microestimation of fibrinogen and seromucoid in plasma. Clin. Chem. 13: 650, 1967.
30. RATONOFF, O. D. & C. MENZIE
A new method for the determination of fibrinogen in small samples of plasma. J. Lab. Clin. Med. 37: 316, 1951.
31. REINER, M. & HELEN L. CHEUNG
Fibrinógeno. Cap. XI en Seligson, D. Métodos seleccionados de análisis clínicos. Vol. III, XIX, + 314 pp., Aguilar, S. A. de Ediciones, Madrid, 1962.
32. ROTHNIE, N. G.
A rapid and simple method for estimating fibrinogen. J. Clin. Path. 17: 319, 1964.
33. RUIZ, G. & TERESA JIMENEZ
Técnica rápida de microprecipitación en tubo capilar para determinación de fibrinógeno. Rev. Mex. Lab. Clin., XVII(6), 1965.
34. SÁNZ, G. F. & FLOR SOLANO
Análisis de proteínas séricas en niños sanos recién nacidos. Rev. Méd. Hospital Nacional de Niños 3(2): 113, 1968.
35. SCHNEIDER, CH. L.
Rapid estimation of plasma fibrinogen concentration and its use as a guide to therapy of intravascular defibrination. Am. J. Obst. Gynec. 64: 141, 1952.

36. STIRLAND, R. M.
Rapid method for estimating fibrinogen. *Lancet* 1, 672.
37. VINCENT, D., G. SEGONZAC & M. R. LACROIX
Le dosage rapide du fibrinogène. *Ann. Biol. Clin.* 20: 673, 1962.
38. VINCENT, D.
Détermination rapide de la fibrinémie. *Extrait de la Presse Médicale* 53: 2580, 1962.
39. WYCOFF, H. D.
A microassay for plasma fibrinogen. *J. Lab. and Clin. Med.* 47: 645, 1956.