

ALONE
\$500

FECHA DE DEVOLUCION

El último sello marca la fecha tope para ser devuelto este libro.

Vencido el plazo, el lector pagará 5.00 peso por cada día que pase. (11-013)

~~09 FEB. 1995~~
~~29 FEB. 1995~~

UNIVERSIDAD DE MONTERREY
VENGIMIENTO
FEB. 13 1995
BIBLIOTECA

Clasif.

040.6151

M361e

1973

C.1

UNIVERSIDAD DE MONTERREY

Instituto de Ciencias

Naturales y Exactas

Título:

"ESTUDIO COMPARATIVO DE TRES VARIANTES
DE LA TECNICA DE FOLIN-WU PARA LA
DETERMINACION DE CREATININA EN SUERO"

Autor:

Tesina que presenta

Berta Alicia Marroquín Rodríguez

En opción al título de

Químico Farmacéutico Biólogo

folio 800 546

Monterrey, N. L.

Mayo de 1973.

**BIBLIOTECA
UNIVERSIDAD DE MONTERREY**

800546

BIBLIOTECA
UNIVERSIDAD DE MONTEVIDEO

Con cariño y gratitud

a mis padres:

Gudelio y Evangelina.

A la memoria de mi hermano

Dr. Gudelio, mi apoyo y mi

guía durante toda mi carrera.

A mis hermanos:

Severino y Ma. de la Luz

Juventino y Hortensia

Ovidio y Graciela

Jesús y Eva

Gustavo y Gloria

y Adilia

A la Universidad Labastida.

A todos mis maestros con gratitud.

Con especial agradecimiento
a mis maestros:

Sr. José Vargas Mena, Q.F.B., M.Sc.
Q.F.B. María Teresa Garza Gallardo.
Q.F.B. Blanca Silvia Garza Fernández.
I.Q. Aureliano García Fernández.

Por su valiosa colaboración en la
elaboración de esta tesina.

Este trabajo se efectuó en
el Laboratorio de Análisis
Clínicos Servicio Social -
"Labastida".

Bajo la dirección del Sr.-
José Vargas Mena

Q.F.B., M.Sc.

INDICE

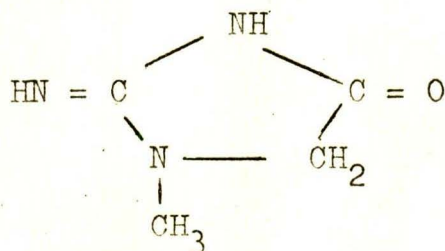
Introducción	1
Material y métodos	11
Resultados	22
Discusión y conclusiones	37
Resumen	40
Bibliografía	41

INTRODUCCION

La creatinina es un producto del metabolismo - de las proteínas del organismo, es eliminada por la orina en cantidad proporcional al tejido muscular activo y no a la ingestión de proteínas.

La creatinina representa una pequeña parte de la fracción del nitrógeno no proteínico; contiene 37.2 % de nitrógeno (1)(2).

Tiene un punto de fusión de 260°C, temperatura a la cual se descompone; es soluble en agua y alcohol. - Su peso molecular es 113. 1197. Su fórmula es la siguiente:



En la biosíntesis de la creatinina, intervienen directamente 3 aminoácidos: la glicina, la arginina-

y la metionina.

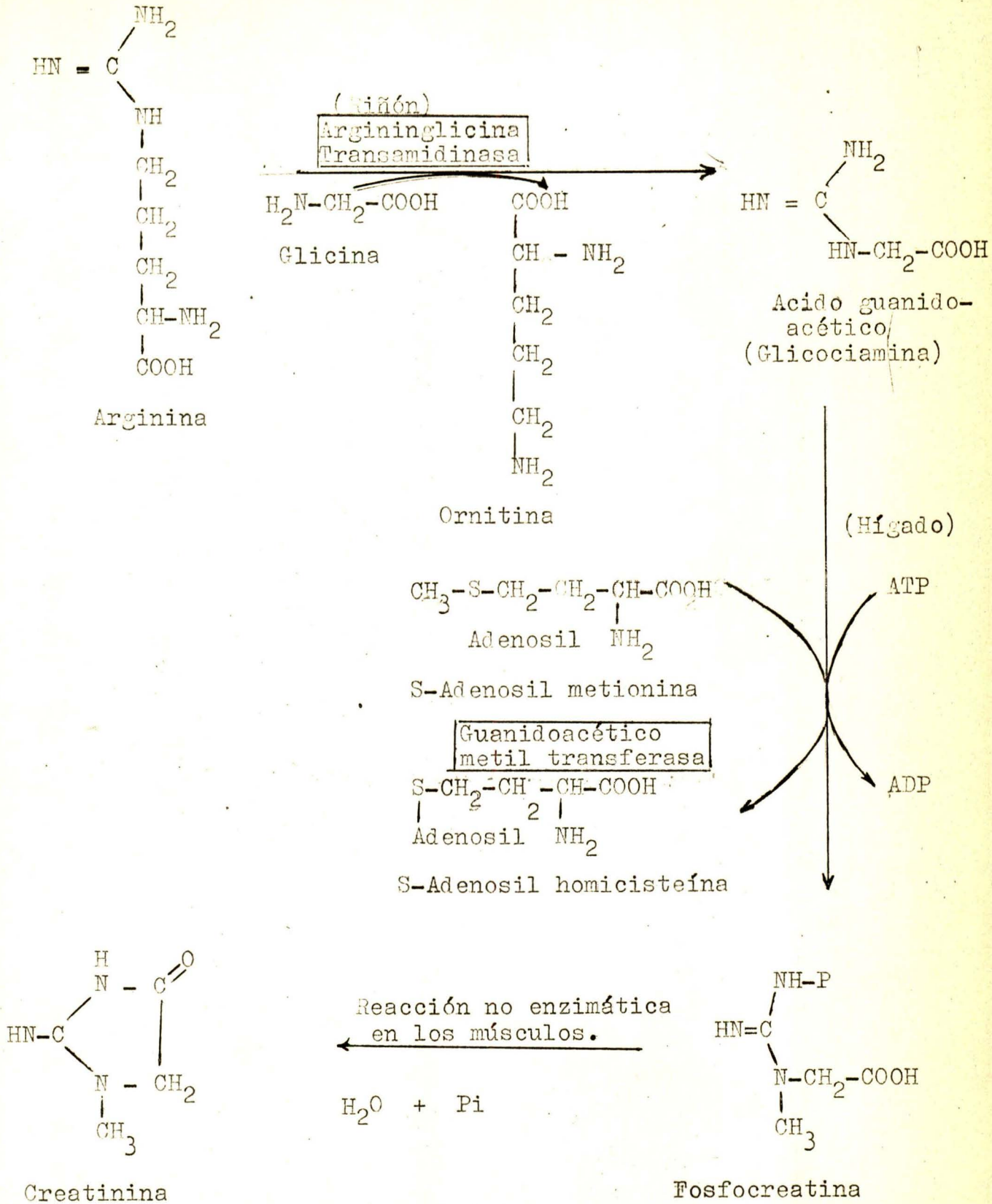
El origen de la creatinina que aparece en la figura # 1, se ha establecido por medio de estudios metabólicos y confirmados por técnicas con isótopos.

La primera reacción (reversible), es la transaminación de la arginina a la glicina para formar ácido guanidoacético (glicociamina)(3). Hoberman demostró que este ácido, precursor fisiológico de la creatina se encuentra normalmente en el suero sanguíneo (4). En experimentos "in vitro" se ha demostrado que esto ocurre en el riñón, pero no en el hígado o en el músculo cardíaco. También se ha demostrado que el páncreas puede sintetizar glicociamina. La enzima que actúa en este paso (transaminidasa) está sujeta al fenómeno de retroalimentación química.

El siguiente paso, es la metilación de la glicociamina en el hígado para formar creatina. En esta reacción, la metionina "activa" es la substancia donadora de metilos. Dicha metilación no es reversible. Ni la creatina ni la creatinina pueden metilarse a la homocisteína y transformarla en metionina. El ATP y el oxígeno son requeridos para la metilación de la creatina.

Otros donadores de metilo tales como la betaina o la colina, después de oxidarse a betaina, tam-

Figura # 1. Biosíntesis de la creatinina.



bién pueden servir indirectamente al producir metionina por metilación de la homocisteína (3).

La creatina en estado libre y como fosfocreatina, es distribuida del hígado por medio de la sangre al músculo y al cerebro. Aproximadamente el 98 % de la fosfocreatina se encuentra en el músculo, donde actúa como depósito de alta energía convertible fácilmente en ATP (5). El total de creatina y fosfocreatina es aproximadamente de 400 mg. por 100 gramos de músculo fresco. Ambos compuestos se convierten espontáneamente en creatinina a una velocidad aproximada de 2 % por día. La creatinina es el producto residual derivado de la creatina y es eliminada en la orina (2).

La pérdida espontánea de ácido fosfórico de la fosfocreatina en el músculo bajo condiciones fisiológicas normales con formación del anillo, es la reacción principal que produce creatinina. La reacción enzimática más lenta, consiste en la pérdida de agua de la creatina que también forma creatinina en el músculo (5).

Los valores normales de creatinina en sangre varían desde 0.5 a 1.8 mg./100 ml., dependiendo del método utilizado. La cifra sanguínea es muy constante, puesto que prácticamente no varía con el régimen de la dieta, siendo casi enteramente de origen endógeno.

La fuente exógena de creatinina, no tiene efecto perceptible en el nivel sanguíneo. La creatinina que se ingiere (por los alimentos, carnes, etc,) difunde rápidamente y es excretada principalmente por los riñones, y una cantidad muy pequeña es eliminada en las heces; así mismo, el nivel sanguíneo de creatinina no es muy afectado por el ejercicio, edad o sexo.

Se ha encontrado un ligero incremento en el nivel de creatinina en el suero en condiciones clínicas que son caracterizadas por azotemias causadas por degradación excesiva de proteínas. Concentraciones elevadas de creatinina en suero ocurren cuando hay un trastorno en la función renal, por ejemplo una formación o excreción insuficiente de orina, aunque debe aclararse que un incremento de creatinina en suero, no necesariamente indica enfermedad renal; factores extrínsecos al riñón pueden ser también responsables de su elevación (6).

También se han encontrado valores elevados de creatinina (5 mg. % o más) en suero en estados de insuficiencia renal como en la nefritis crónica, donde también el nitrógeno de la urea está elevado. El pronóstico suele ser fatal a corto plazo. Esto sucede en las fases avanzadas.

En la nefritis aguda, generalmente no hay ele-

vación de creatinina; en los casos en que exista (40 %) - es un cambio reversible y de escaso valor pronóstico.

Se encuentran así mismo valores elevados de -- creatinina en suero, en las nefrosis por tóxicos (mercurio, plata, etc.); en obstrucciones urinarias como en -- la obstrucción prostática, carcinoma de la vejiga y -- obstrucción intestinal, con marcada oliguria y anuria. - Dicha elevación es reversible de acuerdo a la reparación de la obstrucción. Los niveles altos de creatinina estan generalmente acompañados por una elevación de ácido úrico y urea. Niveles bajos de creatinina en suero han sido encontrados en la atrofia muscular avanzada (7)(8).

La creatinina es excretada en la orina en ---- forma constante y proporcional al tamaño del individuo, - o sea su masa muscular, e independientemente de las va-- riaciones de la dieta.

En los casos en que se asocia un mayor catabolismo, se excretan mayores cantidades, tal como ocurre - en la fiebre tifoidea, neumonía y tétanos. Se observa -- una excreción menor en alteraciones asociadas con atro-- fia muscular, anemia, degeneración avanzada del riñón y leucemia (4).

Normalmente se excretan en la orina de 1 a 1.8

gramos de creatinina al día.

El coeficiente de creatinina es la relación -- entre la cantidad de creatinina excretada en 24 horas y el peso corporal en kilogramos. Habitualmente es de 20 - a 26 mg./Kg. al día en hombres normales y de 14 a 22 mg./Kg. al día en mujeres normales. Debido a que esta relación es constante en un individuo dado, el coeficiente de creatinina puede servir como un índice de que la recolección de la muestra de orina de 24 horas fué hecha - correctamente(3).

La creatinina es retirada del plasma por filtración glomerular, y luego es eliminada en la orina sin ser reabsorbida por los túbulos en grado significativo.- De ello resulta una velocidad de depuración de creatinina relativamente alta, en comparación, por ejemplo con la depuración de la urea (125 ml./min. comparado con 70-ml/min.). En presencia de riego sanguíneo renal normal, todo aumento en los valores de creatinina por encima de 2 a 4 mg. μ , sugiere daño renal que puede ser de moderado a serio (2).

De lo expuesto anteriormente, se deduce la importancia que tiene la creatinina en el diagnóstico y -- pronóstico de algunas enfermedades, por lo tanto se ha hecho un estudio comparativo de tres técnicas para la --

determinación de creatinina en suero, dada su importancia en el laboratorio clínico.

La creatinina puede ser determinada en cualquier líquido biológico, pero las muestras que se emplean más comúnmente son plasma, suero y orina. Por lo general se evita la sangre total, porque en los eritrocitos hay algunas sustancias que pueden dar reacciones falsas positivas.

Muchos de los métodos utilizados en la determinación de creatinina se basan en la reacción de Jaffé, aunque desafortunadamente esta reacción no es muy específica. Entre éstos métodos tenemos:

a).- Método de adsorción con el Reactivo de Lloyd (tierra Fuller purificada). En este método la creatinina es separada de los cromógenos no específicos. Sin embargo la elución no siempre es completa y varía con la preparación del reactivo de Lloyd. Un "standard" de creatinina debe ser tratado simultáneamente con la muestra de suero. Este método lleva mucho tiempo y por lo tanto es indeseable en la rutina de laboratorio.

b).- Método de desproteínización de suero directo con ácido pícrico. Ello parece eliminar al final algunas de las interferencias de los cromógenos no específicos. La determinación es rápida y simple y los resultados son comparables con aquellos obtenidos con el reactivo de

Lloyd. El suero debe estar libre de hemólisis porque los eritrocitos contienen cromógenos inespecíficos (11).

c).- Método de Folin-Wu. En este método, otras sustancias reductoras (por ejemplo ácido ascórbico, piruvato, glucosa y sobre todo ergotionina y glutatión) reaccionan con el ácido pícrico, pero el grado de desarrollo de color es considerablemente más bajo con esos cromógenos -- inespecíficos que con la creatinina. Además y afortunadamente, casi todas esas sustancias que pueden dar --- reacción falsa positiva, se encuentran dentro de la célula, y por lo tanto se obtienen resultados más exactos -- trabajando con suero o plasma en lugar de sangre total -- (11)(12).

Otro método utilizado en la determinación de creatinina diferente de los anteriores, es el método en el cual se usa ácido dinitro benzoico. El color desarrollado en ésta reacción es inestable y la reproducibilidad por lo tanto no muy satisfactoria (11).

Las técnicas más usadas son aquellas que utilizan un filtrado libre de proteínas y determinación --- posterior de creatinina con un picrato alcalino (reacción de Jaffé).

El objeto de la presente tesina es buscar una técnica adecuada para ser adaptada como técnica de ruti-

na en el Laboratorio de Análisis Clínicos Servicio So---
cial Labastida.

La técnica escogida deberá llenar los siguientes requisitos:

a).- Ser reproducible dentro de los límites --
aceptables para los valores conocidos en la población.

b).- No estar sometida a muchas fuentes de --
error.

c).- Que no requiera de reactivos de elevado --
costo o de difícil preparación y que sean fácilmente --
obtenibles en el mercado.

d).- Que sea practicable con el equipo con el-
que cuenta el laboratorio.

e).- Que no requiera demasiado tiempo.

De las técnicas previamente mencionadas se se-
leccionaron 3 y se planeó un estudio comparativo de ellas
con objeto de determinar cual respondería mejor a los --
requisitos ya señalados.

MATERIAL Y METODOS

Los métodos utilizados en este trabajo son los de Folin-Wu, todos ellos basados en la Reacción de Jaffé.

La técnica # 1 es la de Folin-Wu original (13). La técnica # 2 es una modificación de Folin-Wu (14). La técnica # 3 es también una modificación de la de Folin-Wu pero sin precipitación de proteínas (+).

Con cada técnica se hicieron un total de 15 -- determinaciones en un "pool" de sueros, las cuales fueron programadas para verificarse en 5 eventos por tripli cado.

Preparación del "pool" de sueros. Las muestras de sangre que se emplearon para preparar el "pool" de --

(+) Técnica dada por comunicación verbal por el Dr. Roberto Pérez Herrera.

sueros se obtuvieron de personas, seleccionadas al azar que asistieron al Laboratorio de Análisis Pediátricos -- durante el mes de marzo de 1973. A cada una de ellas se les extrajo, por punción en el plieque del codo con aguja calibre 21, de 5 a 10 ml. de sangre. Cada una de estas muestras fué depositada en un tubo de 13 x 100 mm., -- se dejó coagular y retraer el coágulo, y se separó el -- suero por centrifugación. Los sueros hemolizados o turbios fueron descartados. Las porciones de suero así -- obtenidos se fueron juntando en un matraz que se mantuvo constantemente en el congelador (-4°C). Una vez recogida la cantidad adecuada de suero se descongeló a temperatura ambiente, se homogenizó por rotación y se repartió en tubos de 12 x 75 mm., estos tubos se congelaron (-4°C) y se mantuvieron a ésta temperatura hasta el momento de -- ser usados. Los volúmenes contenidos en cada tubo, fueron los necesarios para hacer las 3 determinaciones correspondientes a cada serie, de tal manera que en cada -- ocasión se sacó un tubo del congelador, se descongeló a temperatura ambiente y se utilizó de inmediato para hacer las tres determinaciones. Todo este procedimiento se llevó a cabo con material previamente lavado con mezcla-crómica, enjuagado con agua libre de iones y esterilizado en autoclave.

1.- Método de Folin-Wu (13).

a).- Reactivos:-

- 1) Acido sulfúrico 2/3 N. Se diluyen 18.4 ml. de ácido sulfúrico concentrado en un litro de agua.
- 2) Tungstato de sodio al 10 %. Se disuelven 100 gr. de tungstato de sodio en un litro de agua.
- 3) Acido picrico 0.04 M. Se disuelven 10.5 gr. de ácido pícrico en un litro de agua.
- 4) Hidróxido de sodio 0.75 N. Se disuelven 30 gr. de hidróxido de sodio en un litro de agua. Se guarda en botellas de polietileno o en botellas resistentes al álcali.
- 5) Solución "stock" de creatinina. Se disuelven 1.5 gr. de creatinina en 10 ml. de ácido clorhídrico concentrado y se afora a un litro con agua. Esta solución contiene 1.5 mg. de creatinina por mililitro, y es estable cuando es guardada en el refrigerador.
- 6) "Standard" de trabajo. Se diluyen 1 ml. de la solución "stock" en 100 ml. de agua. Esta solución contiene 0.015 mg. de creatinina por mililitro. No es estable y debe ser preparada cuando se va a emplear.

b).- Procedimiento:-

Se colocan en un tubo 2 ml. de suero, se le añaden 3 ml. de agua y 1 ml. de solución de tungstato de sodio. Se mezclan. Se le añade luego 2 ml. de la solución de ácido sulfúrico. Se tapa el tubo y se mezcla por inversión. Se centrifuga a 2,000 rpm por 5 min.

Se prepara la siguiente serie de tubos:

	Bco.	St ₁	St ₂	St ₃	P.
Filtrado libre de proteínas	-	-	-	-	3ml.
Agua	3ml.	2ml.	1ml.	-	-
"Standard"	-	1ml.	2ml.	3ml.	-
Ac. pícrico	1ml.	1ml.	1ml.	1ml.	1ml.
NaOH	1ml.	1ml.	1ml.	1ml.	1ml.

Se mezclan y se dejan reposar a temperatura ambiente por 20 minutos y se leen a 520 nm.

c).- Cálculos:-

$$\frac{D.O.P}{D.O.St.} \times \frac{8}{2} \times \frac{X}{X} \times \frac{100}{3} = S = \text{mg. de creatinina en 100 ml.}$$

Donde "S" representa la cantidad de creatinina añadida al tubo del "standard": por ejemplo 0.015, 0.030, 0.045 mg. cuando 1, 2 y 3 ml. del "standard" son usados.

d).- Preparación de una curva de calibración:-

De la solución "stock" se preparan las siguientes soluciones "standard":

"Standard" # 1.- Se toma 1 ml. de la solución "stock" y se diluye con agua hasta hacer un volumen de 500 ml. Esta solución contiene 0.003 mg. de creatinina

por 100 ml.

"Standard" # 2.- Se toma 1 ml. de la solución-
"stock" y se diluye a 100 ml. con agua. Esta solución --
contiene 0.015 mg, de creatinina por 100 ml.

Estas dos soluciones deben prepararse cada vez
que se necesiten.

Se prepara la siguiente serie de tubos: (las -
cantidades mencionadas son mililitros).

	Bco.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
St. 1	-	0.5	1	2	3	-	-	-	-	-
St. 2	-	-	-	-	-	1	1.5	2	2.5	3
Agua	3	2.5	2	1	-	.2	1.5	1	0.5	-
Acido pícrico	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
NaOH	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Se mezclan y se dejan reposar a temperatura --
ambiente por 20 minutos. Se leen a 520 nm.

Las soluciones anteriores tienen concentracio-
nes equivalentes a 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0
y 6.0 mg. de creatinina en 100 ml. respectivamente.

2.- Método de Folin-Wu modificado (14)

a).- Reactivos:-

- 1) Tungstato de sodio al 10 %. Se disuelven 100 gr. de tungstato de sodio en un litro de agua.
- 2) Acido sulfúrico 1/12 N. Se diluyen 1.15 ml. de ácido sulfúrico concentrado en 500 ml. de agua.
- 3) Acido pícrico al 1 %. Se disuelven 12 gr. de ácido-pícrico (grado reactivo) en un litro de agua. (Los 2 gr. extra son por la cantidad de agua de hidratación en el ácido pícrico sólido).
- 4) Hidróxido de sodio al 10 %. Se disuelven 100 gr. de hidróxido de sodio en un litro de agua.
- 5) Acido clorhídrico 0.01 N. Se diluyen 1.6 ml. de ácido clorhídrico concentrado a 2 litros de agua.
- 6) Reactivo de picrato alcalino. Se mezclan 5 volúmenes de la solución de ácido pícrico y un volumen de la solución de hidróxido de sodio. Se prepara la cantidad necesaria justo antes de usarse y no dejar pasar más de 5 minutos después de su preparación.
- 7) Solución "stock" de creatinina. Se disuelven 1.0 gr. de creatinina en un poco de ácido clorhídrico 0.01 N. Se afora después a 1 litro con esa misma solución. Se añaden unas cuantas gotas de tolueno como preservador. Esta solución contiene 1 mg. de creatinina por mililitro. Debe guardarse en el refrigerador.
- 8) "Standard" de trabajo. Se diluyen 3 ml. de la solución "stock", más 5 ml. de ácido clorhídrico 0.01 N.

en 500 ml. de agua. Se añade tolueno como preservador. Esta solución contiene 0.03 mg. de creatinina en 5 ml. Debe guardarse en el refrigerador.

b).- Procedimiento:-

Se pipetea 16 ml. de la solución de ácido sulfúrico en un matraz erlenmeyer de 125 ml. Se añaden agitando 2 ml. de suero. Se deja reposar por 10 min. Se añaden después 2 ml. de tungstato de sodio. Se agita y se deja reposar por 10 min. Se filtra. Se prepara la siguiente serie de tubos:

	Bco.	St.	P.
Filtrado libre de proteínas	-	-	5ml.
Agua	5ml.	-	-
"Standard"	-	5ml	-
Reactivo de picrato alcalino	2.5ml.	2.5ml.	2.5ml.

Se mezclan y se dejan reposar por 20 minutos - (importante leerse a éste tiempo). Se leen a 520 nm.

c).- Cálculos:-

$$\frac{D.O.P}{D.O.St.} \times 6 = \text{mg. de creatinina en 100 ml.}$$

d).- Preparación de una curva de calibración:-

Con el "standard" de trabajo, el cual contiene 0.006 mg. de creatinina por mililitro, se prepara la siguiente serie de tubos:

	Bco.	1	2	3	4	5	6	7	8
"Standard"	-	0.5	1	1.5	2	2.5	3	4	5
Agua	5	4.5	4	3.5	3	2.5	2	1	-
Reactivo de picrato alcalino	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

(Las cantidades empleadas están dadas en mililitros).

El picrato alcalino se añade a intervalos de tiempo, y se lee cada tubo exactamente a los 20 min. a 520 nm.

El equivalente en mg. de creatinina por 100 ml. es el siguiente: 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3.0, 3.6, 4.8 y 6 - respectivamente.

3.- Método de Folin-Wu sin precipitación de proteínas (+).

(+) Técnica dada por comunicación verbal por el Dr. Roberto Pérez Herrera.

a).- Reactivos:-

- 1) Solución saturada de ácido pícrico a 4°C. Se pesan 12.5 gr. de ácido pícrico y se ponen a ebullición en un volúmen de 1 litro de agua. En ese momento se transfiere al refrigerador y se deja reposar hasta el día siguiente. Se filtra a travéz de gasa, y el residuo sirve como base para el próximo reactivo.
- 2) Hidróxido de sodio al 10 %. Se pesan 100 gr. de hidróxido de sodio y se disuelven en un litro de agua.
- 3) Reactivo de picrato alcalino:
Solución saturada de ácido pícrico.... 5 ml.
Solución de hidróxido de sodio 1 ml.
- 4). Acido clorhídrico 0.01 N. Se diluyen 1.6 ml. de ácido clorhídrico concentrado en 2 litros de agua.
- 5) Solución "stock" de creatinina: Se disuelven 1.0 gr. de creatinina en un poco de ácido clorhídrico 0.01 N. Se afora después a un litro con esa misma solución. Se añaden unas cuantas gotas de tolueno como preservador. Se guarda en el refrigerador. Esta solución contiene 1 mg. de creatinina por mililitro.
- 6) "Standard" de trabajo. Se diluye 1 ml. de la solución "stock" en 100 ml. de agua. Esta solución contiene 1 mg. de creatinina por cada 100 ml.

b).- Procedimiento:-

Se prepara la siguiente serie de tubos:

	Bco.	St.	P.
Agua	2.2 ml.	2.0ml.	2.0ml.
"Standard"	-	0.2ml.	-
Suero problema	-	-	0.2ml.
Reactivo de picrato alcalino	1.0ml.	1.0ml.	1.0ml.

Se dejan reposar a temperatura ambiente por 15 min. Se leen a 520 nm.

c).- Cálculos:-

$$\frac{D.O.p}{D.O.St} \times 1 = \text{mg. de creatinina en 100 ml.}$$

d).- Preparación de una curva de calibración:-

De la solución "stock" se preparan 9 soluciones "standard" de la siguiente manera: se toman 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0 y 5.0 ml. respectivamente y cada uno de ellos se afora a 100 ml. con agua. - Conteniendo como equivalente de creatinina en mg. % 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0 y 5 respectivamente.

Se prepara la siguiente serie de tubos:

	Rco.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Agua	2.2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
St. 1	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-
St. 2	-	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-
St. 3	-	-	-	0.2	-	-	-	-	-	-
St. 4	-	-	-	-	0.2	-	-	-	-	-
St. 5	-	-	-	-	-	0.2	-	-	-	-
St. 6	-	-	-	-	-	-	0.2	-	-	-
St. 7	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-	-
St. 8	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-
St. 9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2
Reactivo de picrato	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

(Las cantidades estan dadas en mililitros).

Se dejan reposar por 15 min. a la temperatura ambiente. Se leen a 520 nm.

RESULTADOS

En las tablas Nos. 1, 2 y 3, se presentan los valores obtenidos en cada una de las determinaciones de las soluciones de concentración conocida. La concentración está expresada en mg. por 100 ml.

En la tabla # 1 estan los valores obtenidos -- por el método # 1; en la # 2 los valores obtenidos por el método # 2; y en la tabla # 3, los valores obtenidos por el método # 3.

Se calculó la media aritmética para cada solución y los valores obtenidos se graficaron. (La fig. # 1 corresponde al método " 1; la figura # 2, corresponde al método # 2 y la figura # 3 al método # 3). En la gráfica se encuentran en el eje de las ordenadas las lecturas -- (D.O.) obtenidas en el espectrofotómetro (+) y en el eje de las abscisas las concentraciones expresadas en mg. de creatinina por 100 ml.

Espectrofotómetro Coleman Junior II A, Modelo 6/20 A.

TABLA # 1

Lecturas obtenidas en el espectrofotómetro para las determinaciones de las soluciones de concentración conocida por el método # 1.

Concentración en mg. por 100ml.	0.2	0.4	0.8	1.2	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0
D.O.	.020	.040	.085	.120	.210	.290	.37	.470	.550
	.020	.040	.090	.120	.200	.300	.375	.475	.570
	.015	.045	.090	.120	.195	.290	.390	.470	.550
	.030	.055	.100	.125	.205	.300	.380	.490	.560
	.030	.055	.100	.130	.200	.300	.380	.490	.565
	.030	.055	.090	.130	.215	.305	.390	.470	.565
	.020	.040	.080	.120	.190	.290	.390	.460	.545
	.020	.040	.080	.120	.200	.290	.380	.485	.560
	.020	.040	.080	.120	.200	.290	.370	.480	.560
Media Aritmética	.023	.046	.088	.123	.202	.295	.383	.477	.558

.600

.500

.400

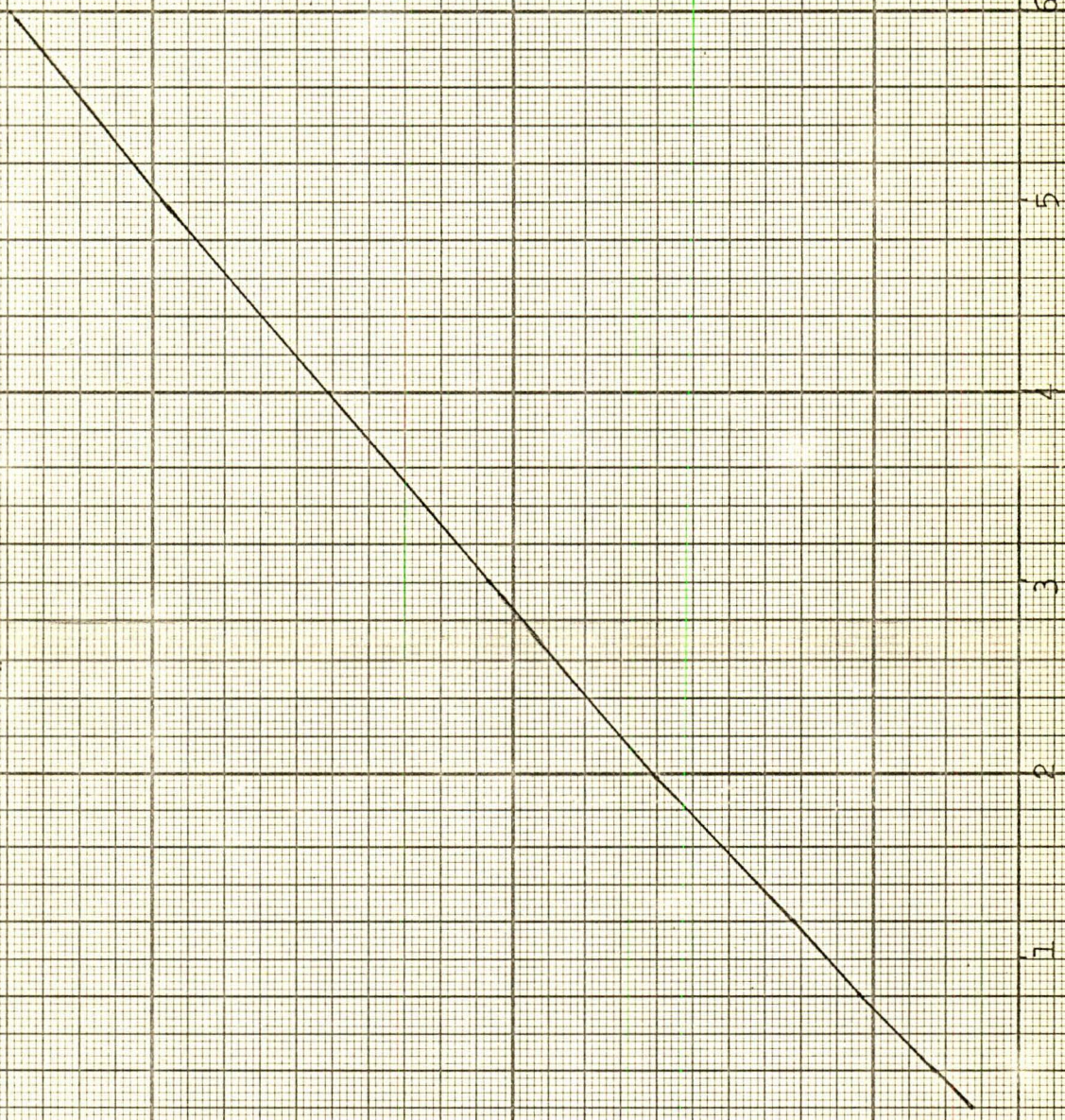
.300

.200

.100

Densidad Optica

Fig. # 1 Curva de calibración del método # 1



mg. de creatinina en 100 ml.

1

2

3

4

5

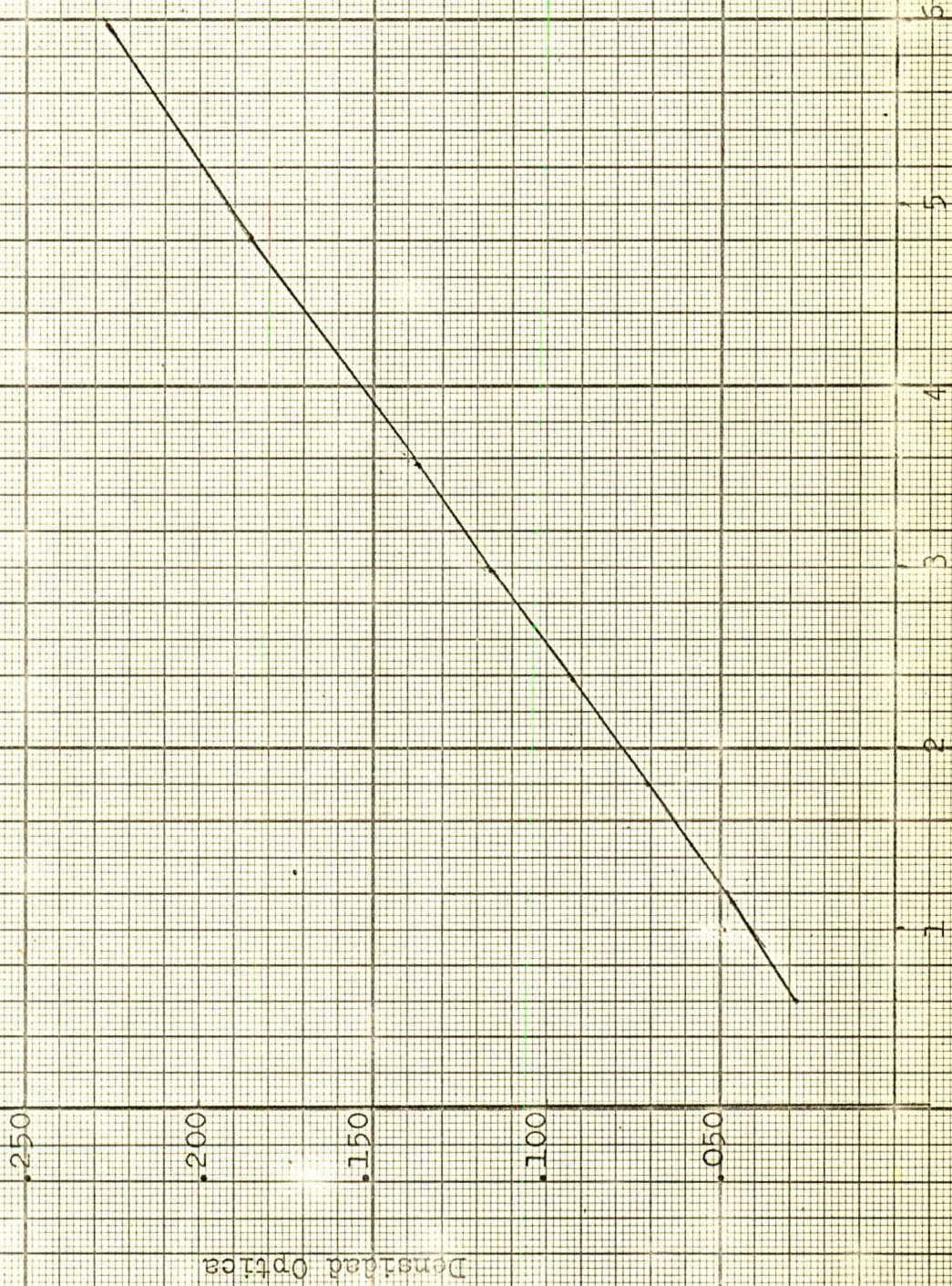
6

TABLA # 2

Lecturas obtenidas en el espectrofotómetro para las determinaciones de las soluciones de concentración conocida por el método # 2.

Concentración en mg. por 100 ml.	0.6	1.2	1.8	2.4	3.0	3.6	4.8	6.0
D.O.	.020	.040	.065	.090	.110	.135	.180	.225
	.020	.040	.070	.090	.110	.140	.180	.225
	.020	.040	.070	.090	.110	.135	.185	.225
	.025	.050	.075	.090	.120	.140	.185	.225
	.025	.045	.075	.095	.120	.140	.190	.225
	.030	.045	.075	.100	.120	.140	.190	.230
	.035	.060	.070	.095	.120	.140	.185	.230
	.035	.060	.070	.095	.120	.140	.185	.225
	.040	.060	.070	.095	.120	.140	.190	.230
Media Aritmética	.028	.049	.071	.093	.117	.138	.186	.227

Fig. # 2 Curva de calibración
del método # 2



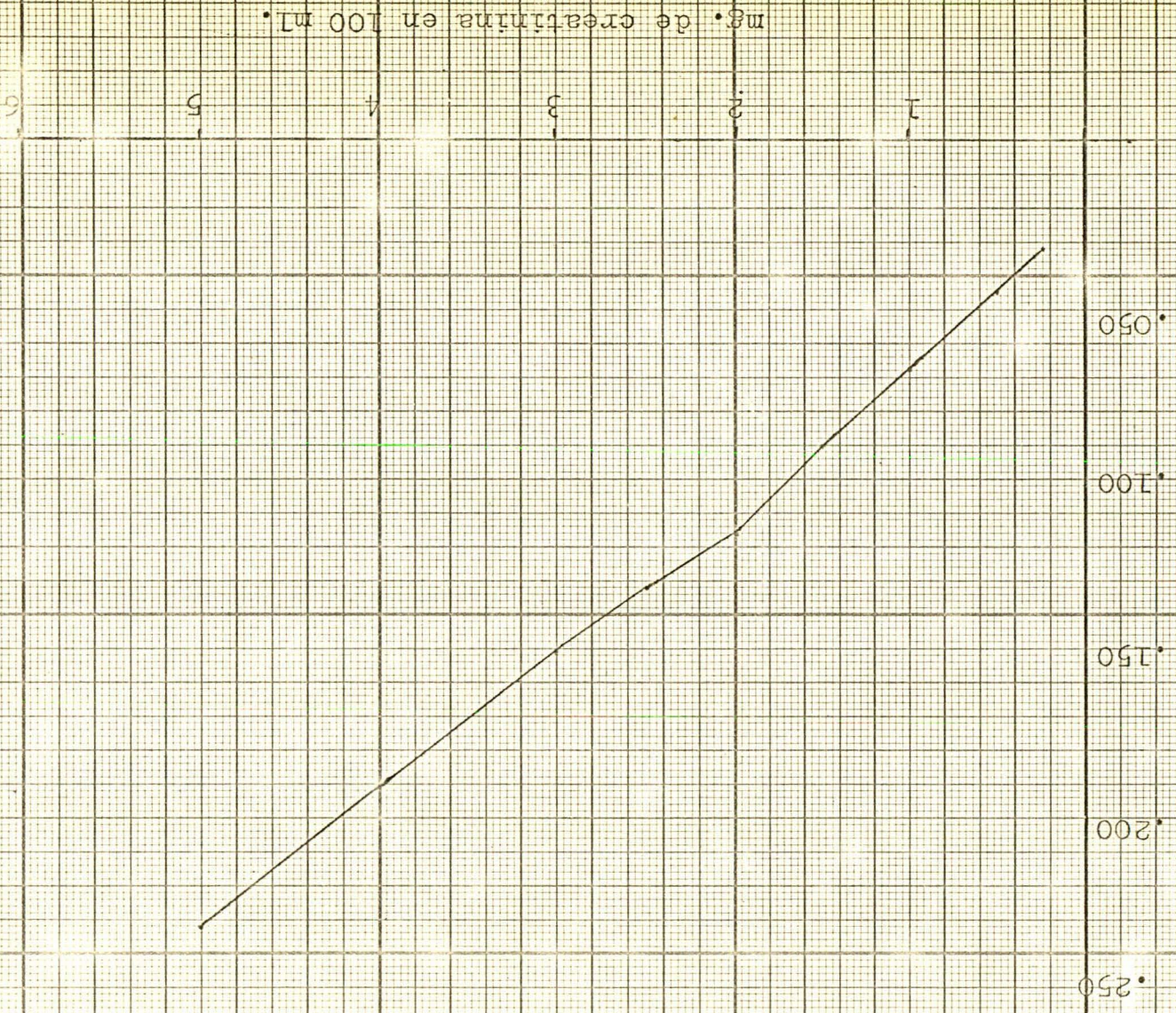
mg. de creatinina en 100 ml.

TABLA # 3

Lecturas obtenidas en el espectrofotómetro para las determinaciones de las soluciones de concentración conocida por el método # 3

Concentración en mg. por 100 ml.	0.25	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0	5.0
D.O.	.060	.075	.110	.135	.160	.180	.195	.230	.275
	.070	.090	.110	.135	.165	.170	.190	.230	.270
	.075	.090	.110	.135	.170	.175	.190	.235	.275
	.010	.030	.050	.075	.095	.120	.140	.170	.220
	.015	.030	.055	.075	.100	.120	.140	.180	.225
	.020	.030	.050	.075	.100	.110	.140	.180	.220
	.010	.020	.040	.060	.080	.105	.120	.160	.200
	.015	.020	.040	.065	.080	.105	.120	.165	.200
	.010	.020	.045	.060	.085	.100	.120	.170	.210
Media Aritmética	.032	.045	.068	.091	.115	.132	.151	.191	.233

Fig. # 3 Curva de calibración del método # 3.



En la tabla # 4 se encuentran los valores obtenidos en las determinaciones del "pool" de sueros por el método # 1. Cada determinación se comparó con 3 soluciones "standard" equivalentes a 2.0, 4.0 y 6.0 mg. de creatinina por 100 ml. respectivamente. Se calculó la concentración según la fórmula ya mencionada contra la lectura del "standard" más cercana a la del problema y se comparó con los valores obtenidos según la curva de calibración.

En la tabla # 5 se encuentran los valores obtenidos en las determinaciones del "pool" de sueros por el método # 2. Cada determinación se comparó con una solución "standard" con un equivalente de 6 mg. de creatinina por 100 ml. Se calculó la concentración según la fórmula ya mencionada y se comparó con los valores obtenidos según la curva de calibración.

En la tabla # 6 se encuentran los valores obtenidos en las determinaciones del "pool" de sueros por el método # 3. Cada determinación se comparó con una solución "standard" que contiene 1 mg. de creatinina por 100 ml. Se calculó su concentración según la fórmula ya mencionada y se comparó con los valores obtenidos según la curva de calibración.

Dentro de las concentraciones que yo trabajé,-

se comprobó que sigue la Ley de Beer. La media aritmética se calculó de acuerdo a los valores obtenidos con las -- curvas de calibración, y posteriormente se determinó -- su desviación "standard" (DS).

Para el primer método la media aritmética de -- las 15 determinaciones fué 0.90; la desviación "standard" (DS) 0.08 que corresponde a un coeficiente de variabilidad de 8.88 %.

Para el segundo método la media aritmética -- calculada en las 15 determinaciones fué de 0.96; la ---- desviación "standard" (DS) 0.07 que corresponde a un -- coeficiente de variabilidad de 7.29 %.

Para el tercer método la media aritmética calculada en las 15 determinaciones fué 1.24; la desviación "standard" (DS) 0.25 que corresponde a un coeficiente de variabilidad de 20.16 %.

De acuerdo a los valores obtenidos anterior--- mente, se trazaron los respectivos diagramas para el con trol de calidad para cada método (figs. 4, 5 y 6 respectivamente).

TABLA # 4

Resultados obtenidos en el "pool" de sueros con le método #1

Serie No.	Concentración de creatinina expresada en mg. por 100 ml.	
	Calculada contra la solución "standard"	Calculada contra la curva de calibración.
1	1.12	1.04
2	1.07	0.98
3	1.07	0.98
4	1.15	1.04
5	1.05	0.94
6	1.05	0.94
7	1.05	0.94
8	1.00	0.88
9	1.05	0.88
10	0.92	0.82
11	0.92	0.82
12	0.88	0.78
13	1.00	0.88
14	0.89	0.78
15	1.00	0.88

TABLA # 5

Resultados obtenidos en el "pool" de sueros con el método #2

Serie No.	Concentración de creatinina expresada en mg. por 100 ml.	
	Calculada contra la solución "standard".	Calculada contra la curva de calibración.
1	1.08	0.96
2	1.08	0.96
3	0.95	0.82
4	1.06	0.96
5	1.06	0.96
6	1.06	0.96
7	1.08	0.96
8	1.08	0.96
9	1.22	1.10
10	1.03	0.96
11	1.03	0.96
12	1.17	1.10
13	1.08	0.96
14	1.08	0.96
15	0.95	0.82

TABLA # 6

Resultados obtenidos en el "pool" de sueros con el método #3

Serie No.	Concentración de creatinina expresada en mg. por 100 ml.	
	Calculada contra la solución "standard"	Calculada contra la curva de calibración.
1	2.22	1.68
2	2.11	1.60
3	2.11	1.60
4	1.50	1.48
5	1.16	1.04
6	1.26	1.26
7	1.36	1.16
8	1.45	1.26
9	1.54	1.36
10	1.55	1.04
11	1.55	1.04
12	1.44	0.92
13	1.55	1.04
14	1.44	0.92
15	1.77	1.26

Fig. # 4 Esquema de un diagrama de control de calidad para el método # 1

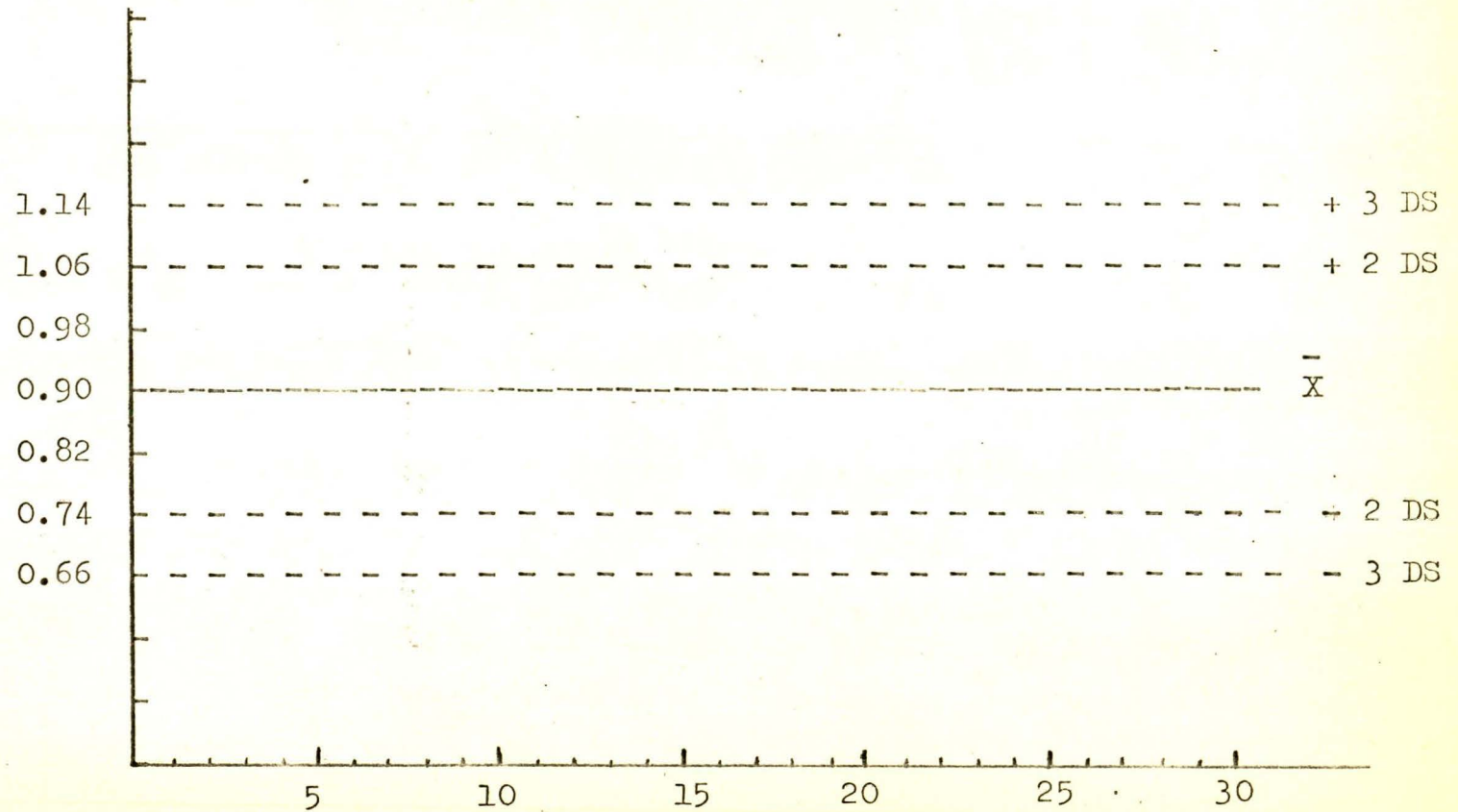


Fig. # 5 Esquema de un diagrama de control de calidad para el método # 2.

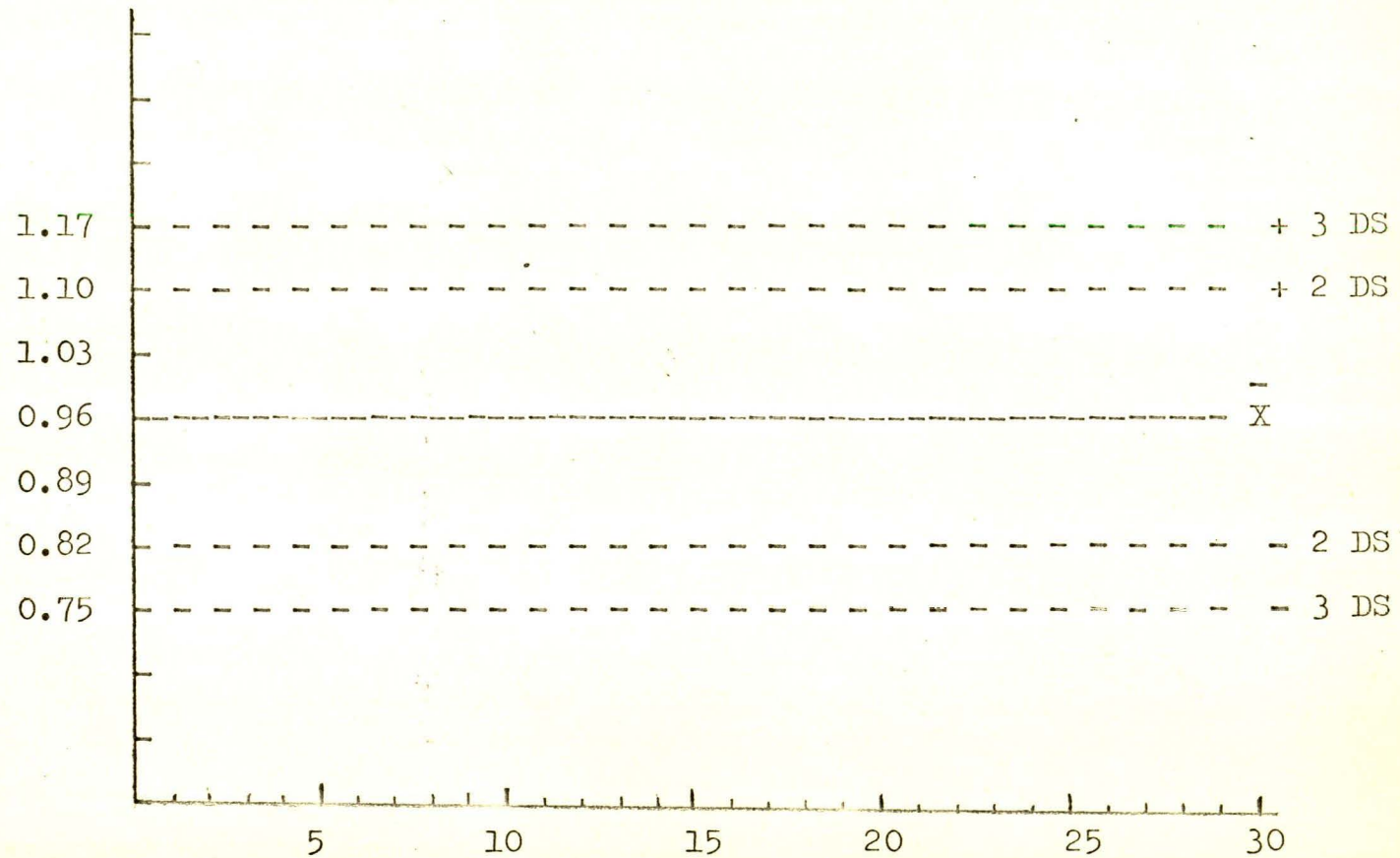
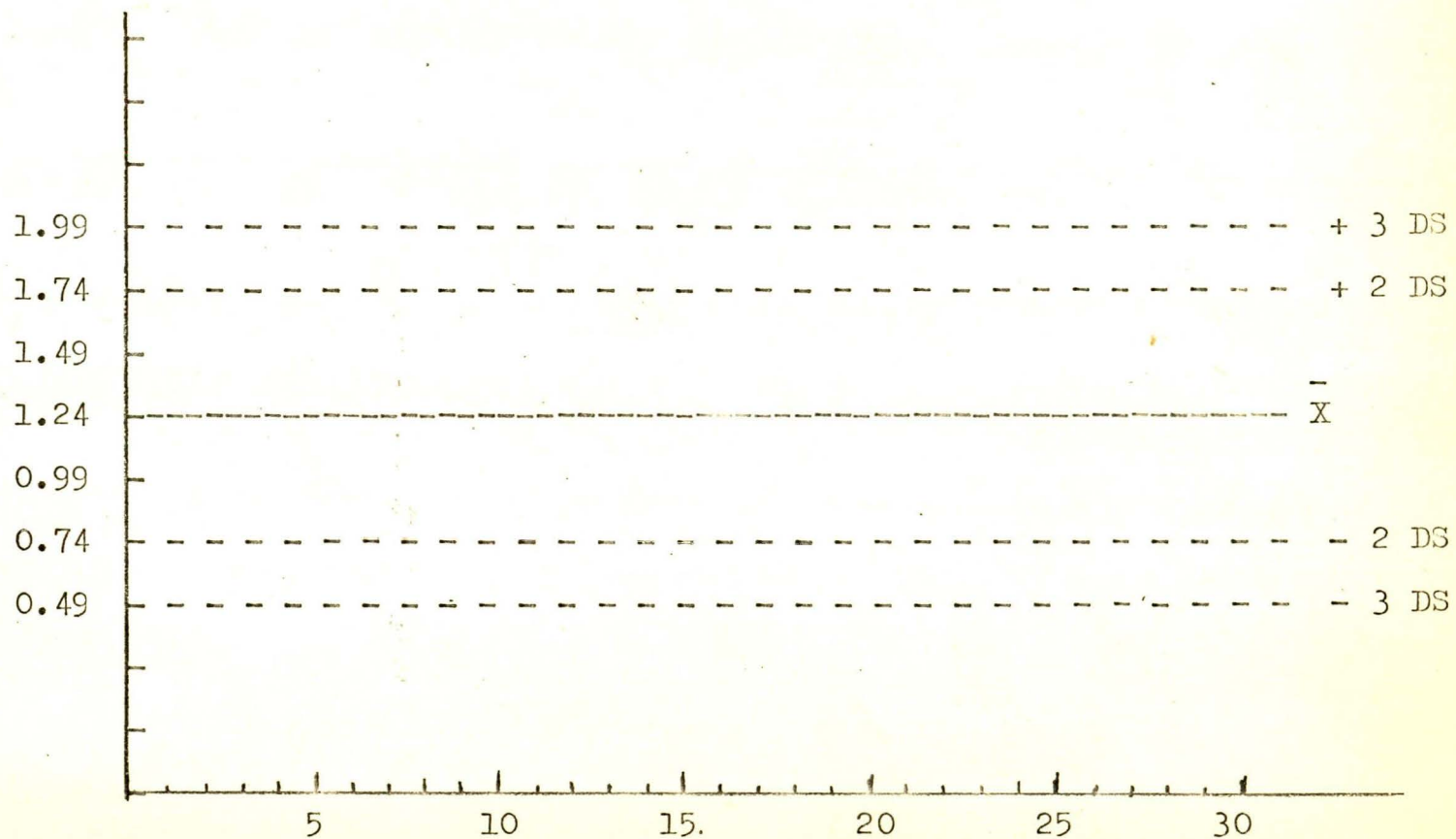


Fig. # 6 Esquema de un diagrama de control de calidad para el método # 3.



DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

Los métodos aquí empleados implican un procedimiento sencillo, una serie de reactivos cuya adquisición es posible y de costo prácticamente bajo. En cuanto a la estabilidad de los reactivos podemos considerar que duran en buenas condiciones por lapsos de tiempo aceptables, excepto el picrato alcalino que debe prepararse -- cada vez que se necesite. El tiempo requerido para cada una de las determinaciones es relativamente corto.

Los dos métodos en los que se emplea filtrado libre de proteínas, pueden ser realizados en sangre total, suero o plasma. Aunque como ya se dijo anteriormente, debe preferirse el suero o plasma, pues así eliminamos interferencias de los cromógenos inespecíficos que se encuentran en los eritrocitos.

Debe procurarse hacer las determinaciones a la misma temperatura, pues este factor las afecta, debido a que el ácido pícrico puede cristalizar cuando la temperatura baja y por lo tanto su concentración en el líquido-

sobrenadante disminuir. Puede suceder el proceso contrario, que el ácido que quedó sin disolver, se disuelva -- debido al aumento de la temperatura, y como consecuencia de esto, ocurran variaciones en la concentración de ácido y por lo tanto una alteración en los valores de los resultados de las determinaciones.

Los errores que pueden cometerse en éstos métodos son principalmente debidos al operador, desde el momento de preparar los reactivos, hasta el momento de hacer las lecturas.

Comparando los métodos 1 y 2 en los que se usa filtrado libre de proteínas, puedo decir que el método " 1 está expuesto a un número mayor de errores, debido a que el procedimiento implica mayor número de pasos. -- Puedo deducir también que en el método # 2, en el que el líquido libre de proteínas se obtiene por filtración, es un proceso más rápido y más sencillo que en el proceso del método " 1, en el que dicho líquido se obtiene por centrifugación y posterior aspiración del sobrenadante, pues se requiere algo de cuidado al hacerlo para evitar aspirar algo del paquete de proteínas precipitadas.

Comparando los valores de las medias aritméticas de los 3 métodos, se observa que el tercero, en que no se efectuó la desproteínización, da valores más altos.

Esto podría ser debido a que las proteínas interfieren en la determinación de creatinina.

Con respecto a la reproducibilidad de éstos 3-métodos podemos considerar lo siguiente: que si el método # 2 muestra un coeficiente de variabilidad de 7.29 %, el método # 1 un coeficiente de variabilidad de 8.88 % y el método # 3 un coeficiente de variabilidad de 20.16 %, es de suponerse que el método más reproducible es el método # 2.

Debe aclararse que en el método # 3 no se emplearon las pipetas adecuadas, y ello indujo seguramente a un error significativo. Por lo tanto dicho método no puedo descartarlo como malo en las condiciones de mi trabajo.

Después de haber considerado detenidamente los puntos anteriormente expuestos, puedo sugerir como método más adecuado para la determinación de creatinina, el método # 2 para que sea establecido como método de rutina en el Laboratorio de Análisis Clínicos Servicio Social Labastida.

RESUMEN

En este estudio se compararon 3 métodos de --- Folin-Wu para la determinación de creatinina sanguínea:-- El de Folin-Wu original; Folin-Wu modificado y Folin-Wu sin precipitación de proteínas.

De un "pool" de suero se hicieron 15 determi-- naciones (5 series con 3 determinaciones cada una). Con los valores obtenidos se calculó la media aritmética, la desviación de "standard" y el coeficiente de variabilidad para cada uno de ellos. Se analizaron los resultados, -- así como las ventajas y desventajas de dichos métodos, - eligiéndose el método. # 2 (Folin-Wu modificado) como método para ser adaptado en el Laboratorio de Análisis -- Clínicos Servicio Social Labastida.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bray, W. E.; Métodos de Laboratorio Clínico. 2a. Ed.; UTENA, México. 557 pp. 1968.
- 2.- Faulkner, W. R. y King, J. W.; Pruebas de la función renal en: Química Clínica Moderna. Ed. -- Tietz, N. W.; Nueva Editorial Interamericana, México. 1010 pp. 1970.
- 3.- Harper, H. A.; Manual de Química Fisiológica. 2a. Ed. Manual Moderno, México. 566 pp. 1969.
- 4.- Levinson, S. A. y MacFate, R. P.; Diagnóstico Clínico de Laboratorio. 2a. Ed.; El Ateneo, Argentina. 1274 pp. 1962.
- 5.- Davidsohn, I. and Henry, J. B.; Todd Sanford Clinical Diagnosis by Laboratory Methods. 14th Ed. Saunders, Philadelphia. 1308 pp. 1969.
- 6.- Miller, S. E.; A textbook of Clinical Pathology. 7th

Ed.; Williams and Wilkins, Baltimore. 999
pp. 1966.

- 7.- Balcells, G. A.; La Clínica y el Laboratorio. Interpretación de Análisis y Pruebas Funcionales. 6a. Ed.; Editorial Marín, España. - 486 pp. 1967.
- 8.- Frankel, S.; Reitman, S.; Sonnenwirth, A. C.; Clinical Laboratory Methods and Diagnosis. 6th Ed.; Mosby, Saint Louis. 2 Vols. 1963
- 9.- Linch, W. J.; Raphael, S. S.; Mellor, L. D.; Spare, P. D.; and Inwood, M. J. H.; Medical -- Laboratory Technology and Clinical Pathology. 2nd. Ed.; Saunders, Philadelphia. 1359 pp. 1969.
- 10.- Davidsohn, I.; Wells, B. B.; Clinical Diagnosis by -- Laboratory Methods. 13th Ed. Saunders, -- Philadelphia. 1020 pp. 1963.
- 11.- Mathebheimer, H.; Micromethods for Clinical Clinical and Biochemical Laboratory. 2nd Ed.; Ann Arbor Science Publishers, Michigan. 232 - pp. 1971.

- 12.- Lynch, M. J.; Raphael, S. S.; Fellor, L. D.; Stare, P. D.; Hills, P. e Inwood, M. J. H.; Métodos de Laboratorio. 1a. Ed. Interamericana, México. 659 pp. 1965.
- 13.- Bauer, J. D.; Ackerman, P. G. and Toro, G.; Bray's Clinical Laboratory Methods. 7th Ed.; -- Mosby, Saint Louis. 764 pp. 1968.
- 14.- Frankel, S.; Reitman.; Sonnenwirth, A. C.; Clinical Laboratory Methods and Diagnosis. 7th Ed. Mosby, Saint Louis. 2 Vols. 1970.

800546