

**PRESENTACIÓN DE UNA NUEVA TÉCNICA DE ELABORACIÓN PROPIA
MANUAL Y AUTOMATIZADA, ULTRASENSIBLE Y CUANTITATIVA,
PARA LA DETERMINACIÓN DE SANGRE OCULTA EN HEMORRAGIAS DIGESTIVAS ALTAS Y BAJAS,
EN ORINA, Y EN OTROS LÍQUIDOS BIOLÓGICOS.**

Lautaro Fidel Bracco, Bioquímico de la Universidad de Buenos Aires (UBA). Becario Doctoral de CONICET. Doctorando de Ingeniería de Procesos Industriales y Biotecnología. Asesor de Investigación y Desarrollo de Procesos del Laboratorio Gamma Nuclear.

Malco Fidel Benjamin Bracco. Técnico Universitario en Ciencias Experimentales. Estudiante avanzado de Licenciatura en Ciencias Químicas de la Universidad de Belgrano, de la ciudad autónoma de Buenos Aires. Pasante del Laboratorio Gamma Nuclear.

José Luis Bracco, Bioquímico, Master en Nutrición y Biotecnología Alimentaria de la Universidad Europea Miguel de Cervantes. Jefe del Laboratorio Gamma Nuclear, Galarza 1082/86, Concepción del Uruguay, Argentina.

1. INTRODUCCIÓN Y ESTADO DEL ARTE:

Los métodos que usualmente se emplean para la determinación de sangre oculta en materia fecal, pueden ser químicos o inmunológicos. Los métodos químicos se basan en la habilidad peroxidasa símil de la hemoglobina y del grupo hem, de oxidar un reactivo cromogénico en presencia de peróxido de hidrógeno, desarrollando color. El método de la ortotoluidina se basa en la actividad peroxidasa de la hemoglobina, o de oxidantes no específicos, de catalizar la reacción del peróxido de hidrógeno y el cromógeno ortotoluidina, para formar o-toluidina oxidada de color azul. Es más sensible que el método clásico, reaccionando con mínimas cantidades de sangre, o de peroxidasa y otros agentes oxidantes, por lo que produce muchos falsos positivos, lo cual le otorga un gran valor a los test negativos como diagnóstico de ausencia de sangrado intestinal. El método del guayacol, por el contrario, tiene una sensibilidad baja lo que le concede valor a las pruebas positivas, que denotan la existencia de sangrado intestinal. El HemoQuant se basa en la detección de derivados porfirínicos de la hemoglobina. Es más específico que el método del guayacol.

Los métodos que usan la reacción de la peroxidasa tienen la gran ventaja de ser económicos y de evaluar hemorragias digestivas altas y bajas, pero tienen como desventajas la baja sensibilidad y la baja especificidad, con resultados falsos negativos y falsos positivos.

Los métodos más modernos, de tipo inmunológico, como la aglutinación inmunoquímica de látex, la inmunodifusión radial simple y la hemoaglutinación reverso pasiva, han sido métodos más sensibles a las concentraciones bajas de hemoglobina humana en heces. Los estudios clínicos indican que los resultados de la prueba son positivos, únicamente, en 50 a 60% de pacientes con cáncer colorectal y, solamente, en 25 a 30% de pacientes con pólipos. Por lo tanto métodos mejores y más sensibles para detectar sangre oculta fecal son importantes para el diagnóstico de enfermedades que dan lugar a sangrado gastrointestinal.

La inmunocromatografía rápida, comercializada también como Hemosure iFOB y otras marcas, revela niveles inferiores de sangre oculta fecal empleando un método inmuno-específico de captura del doble sandwich. Los resultados positivos pueden ser vistos si los niveles de hemoglobina en las heces son tan bajos como 0.05 µg Hb/ml, es decir 50 ng de Hb/ml. La prueba Hemosure iFOB es específica para hemoglobina humana. La hemoglobina de caballo, cerdo, pez, res, gallinas, conejos, ratas, cabras y ratones no reaccionan con esta prueba. La muestra fluye a través del dispositivo absorbente; el anticuerpo, marcado con un colorante, se conjuga con la hemoglobina de la muestra y forma un complejo antígeno-anticuerpo. Este complejo enlaza al anticuerpo anti hemoglobina en la zona de reacción positiva de la prueba y produce una banda de color rosado. En ausencia de hemoglobina, no hay línea en la zona de reacción positiva de la prueba. Los extractos acuosos de melón, coliflor, nabo, rábano, jícama, y 20 mg/ml de solución de peroxidasa, no interfieren en el resultado.

La desventaja de estos métodos inmunológicos reside en que reaccionan contra la molécula de hemoglobina íntegra y, por lo tanto, no evalúan hemorragias digestivas altas; únicamente pueden ser empleados cuando se sospecha sangrado colorrectal.

Presentamos en este trabajo un método automático y manual, ultrasensible y cuantitativo, de elaboración propia, que determina la cantidad de sangre oculta en hemorragias digestivas altas o bajas, en μg de Hb/ml y en ng de Hb/ml, con una sensibilidad similar o mayor que los métodos inmunológicos; basado en el método cromogénico de la 4-aminofenazona.

2. MATERIALES

Reactivos:

- Reactivo 1: 4- aminofenazona (4-AF) 25 mmol/l en buffer TRIS 0.92 mol/l
- Reactivo 2: Fenol, 55 mmol/l
- Reactivo 3: Peróxido de hidrógeno de 2 volúmenes

3. TÉCNICA

- Diluir la materia fecal en agua destilada: un pitsk (pizca) o knifepoint (punta de cuchillo) de materia fecal en 10 ml de agua
- Agitar 5 minutos en agitador
- Centrifugar a 3000 r.p.m.
- Usar el sobrenadante

Si el sobrenadante no es límpido o presenta alguna coloración puede ser necesario añadir un Blanco de Muestras, con 50 μl del sobrenadante, un mililitro de agua destilada, y posterior centrifugación a 3000 rpm.

Técnica Manual:

	Blanco de reactivos	Desconocido	Estándar
Sobrenadante	-	50 μl	50 μl de dilución 1:1000 de sangre edetada, de hemoglobina valorada o conocida
4-AF	10 μl	10 μl	10 μl
Fenol	10 μl	10 μl	10 μl
H2O2 de 2 volúmenes	50 μl	50 μl	50 μl
Incubar 10 minutos a37°C			
H2O (d)	0.9 ml	0.9 ml	0.9 ml

Leer el color magenta producido en espectrofotómetro a 505 nm.

Corregir las lecturas del desconocido y del estándar restándoles la lectura del blanco.

Resultado: (Hemoglobina del Estándar en mg/dl x Lectura del Desconocido) % Lectura del Estándar

Técnica Automática:

- Reactivo 1: reactivo 4-AF 1:50 + reactivo de fenol 1:50
- Reactivo 2: agua oxigenada de 2 volúmenes

FICHA TECNICA:

➤ TIPO:	Color
➤ REFERENCIA:	Factor
➤ LONGITUD DE ONDA:	505 nm
➤ UNIDADES:	µg/ml o ng/ml
➤ VOLUMEN MUESTRA:	100 µl
➤ VOLUMEN 1º REACTIVO:	200 µl
➤ VOLUMEN 2º REACTIVO:	100
➤ 1º INCUBACION:	10 MINUTOS
➤ LIMITE INFERIOR:	0
➤ LIMITE SUPERIOR:	2560
➤ L. BL//L.SUSTRATO:	0.150
➤ TESTIGO:	129 µg/ml
➤ FACTOR:	1100

Sensibilidad: La sensibilidad es del orden de 25 a 40 ng de Hb/ml

Sensibilidad de otros métodos:

- Inmunológico: 200 ng Hb/ml
- Inmunocromatográfico: 50 ng Hb/ml

El presente método es cuantitativo, en sus versiones manual y automatizada, como los mejores métodos automáticos existentes en el mercado, considerados en la actualidad los procedimientos gold estándar de la investigación de sangre oculta; aunque aventaja a dichos métodos en la posibilidad de valorar hemorragias digestivas altas y bajas.

En los métodos automáticos cuantitativos de Fecatest por aglutinación de partículas de látex, el rango de detección va de 0 a 1200 ng Hb/ml de buffer. Esto permite predeterminar el punto de corte para un resultado positivo, que se ha fijado en 100 ng Hb/ml que es lo recomendado por los fabricantes.

En el método que presentamos el rango de detección va desde 0 a más de 1280 µg Hb/ml, y la sensibilidad es del orden de 25 a 40 ng Hb/ml. El punto de corte se ha fijado en 45 ng de Hb/ml.

4. RESULTADOS:

4.1 EN OTROS LÍQUIDOS BIOLÓGICOS: Se estudió la performance del método en muestras de orina sospechosas, sin centrifugar, usando como estándar una dilución 1:1000 de sangre de hemoglobina valorada o conocida, y como estándar interno el número de hematíes del sedimento.

Hematíes por campo 400x	Botón rojo	Hematuria macroscópica	Lectura-Blanco a 505 nm	µg de Hb/ml
Campo totalmente cubierto	Abundante	Dos cruces	$1.236-0.014 = 1.223$	1280
Campo cubierto	Moderado	Una cruz	$0.237-0.014 = 0.223$	128
200	Escaso	Micro hematuria	$0.041-0.014 = 0.027$	12.8
12	No se observa	Micro hematuria	$0.026-0.014 = 0.012$	$0.128 = 128\text{ng/ml}$
6	No se observa	Micro hematuria	$0.018-0.014 = 0.004$	$0.042 = 42\text{ ng/ml}$

En consecuencia:

- Los valores esperados para el sangrado macroscópico son $> 120 \mu\text{g}$ de Hb/ml.
- Los valores esperados para el sangrado microscópico (oculto) son $< 120 \mu\text{g}$ de Hb/ml.
- La mínima lectura capaz de resolver el método es de 42 ng/ml , equivalente a una suspensión que, centrifugada, arroja un resultado del sedimento de 6 hematíes por campo 400x.

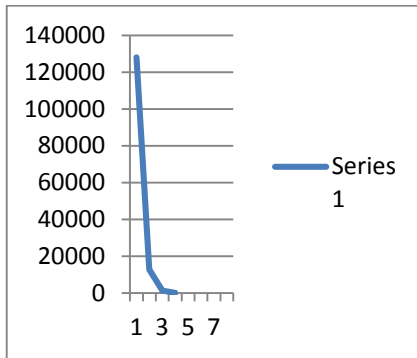


Gráfico n°1: Respuesta del método (μg de Hb/ml) en función del n° de hematíes del sangrado.

- Punto 1: campo 400x totalmente cubierto
- Punto 2: campo 400x cubierto
- Punto 3: 200 hematíes por campo 400x
- Punto 4: 12 hematíes por campo 400x
- Punto 5: 6 hematíes por campo 400x

(Elaboración propia basada en autor)

4.2. EN MATERIA FECAL NORMAL: Un paciente sin signos de sangrado gastroentérico, sometido durante 3 días a una dieta con sobrecarga de carnes rojas, verduras verdes, y a cepillado dental habitual, arrojó el siguiente resultado de la sange oculta en la primera materia fecal del cuarto día, con continuación de la dieta.

Lectura del desconocido: 0.128

Lectura del blanco de reactivos: 0.014

Lectura del blanco de muestra: 0.112

Lectura del desconocido – (Lectura del blanco de reactivos + Lectura del blanco de muestra) = $0.128 - 0.126 = 0.002$

Desconocido = $0.002 \times 10.66 = 0.0213 \mu\text{g/ml} = 21.3 \text{ ng/ml}$

El punto de corte se fija en 2 veces el valor de un paciente normal, sin restricciones dietéticas, con el propósito de descartar algún eventual falso positivo, entonces:

- Negativo: $< 45 \text{ ng/ml}$
- Positivo débil: $45-90 \text{ ng/ml}$
- Positivo: $> 90 \text{ ng/ml}$

4.3. EN EXTRACTOS VEGETALES: Se evaluó la utilidad del método para determinar peroxidasa en extractos vegetales, de importancia para encontrar fuentes de enzima para fines biotecnológicos. Es conocida la peroxidasa del rábano (horseradish peroxidase o HRP), que tiene grandes aplicaciones en técnicas inmunoquímicas y de diagnóstico clínico debido a su gran estabilidad, facilidad de conjugación con las inmunoglobulinas y sencillez para ser detectada por métodos colorimétricos utilizando un gran número de

reactivos como fenoles, aminas aromáticas, moléculas orgánicas complejas como el ABTS ó 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ioduro y glutatión.

Se utilizó un extracto acuoso de harina de soja, el cual arrojó el siguiente resultado:

Lectura del extracto:	0.090
Lectura del blanco:	0.014
Factor en esa zona de la curva:	10.66
Resultado:	810 ng /ml

Una solución de 0.034 U de oxidasas (0.03 U oxidasas + 0.004 U de peroxidasa) evaluada con este método produjo una lectura $L = 0.020$, correspondiente a una concentración de $(0.020-0.014) \times 10.66 = 0.64 \mu\text{g/ml}$ equivalente a 640 ng/ml. De donde se determina que el extracto acuoso de harina de soja empleado (50% p/v) contiene 0.043 U de oxidasas.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Fernández, J. L.; Gallegos, Marta; Brochero, Adriana et al. Pesquisa del cáncer colorrectal con una prueba inmunológica para sangre oculta en materia fecal. A. Ge. La.1999-vol 29-pág. 73-78
2. Allison, James E.; Feldman, Robert; Tekawa Irene S. Hemocult Screening in Detecting Colorectal Neoplasm: Sensitivity, Specificity y Predictive value. Annal of Internal Medicine.1990; 112:328-333
3. Kewenter J.; BjorK, S.; Haglind, Eva, et al. Screening and Rescreening for Colorectal Cancer. Cancer 62:645-651.1988
4. Mandel, Jack S.; Bond, John; Church, Timothy; et al. Reducing Mortality from Colorectal Cancer By Screening For Fecal Occult Blood. The New England Journal of Medicine, Vol.328, N° 19:1365-1371, 1993
5. Mandel, Jack S.; Church, Timothy; Ederer, Fred, et al. Colorectal Cancer Mortality: Effectiveness of Biennial Screening for Fecal Occult Blood. Journal of the National Cancer Institute, Vol. 91, N° 5, March 3, 1999
6. Ransohoff, David; Lang Christopher. Screening for Colorectal Cancer with the Fecal Occult Blood Test: A Background Paper. Ann Intern Med. 1997; 126:811-822
7. Eishi, Yoshinobu. Fecal Occult Blod Tests and Their Pitfalls. JICA, F.Y. 2000

