



Proti 2

Método colorimétrico para la determinación de Proteínas Totales y Albúmina en suero

SIGNIFICACION CLINICA

Las proteínas son compuestos orgánicos macromoleculares, ampliamente distribuidos en el organismo y esenciales para la vida. Actúan como elementos estructurales y de transporte y aparecen bajo la forma de enzimas, hormonas, anticuerpos, factores de coagulación, etc.

La proteína más abundante en plasma es la albúmina. Una de sus funciones más importantes es la de permitir el transporte de ácidos grasos, hormonas esteroides, bilirrubina, catecolaminas, que en forma libre son insolubles en medio acuoso. La concentración de albúmina en plasma influye notablemente en el mantenimiento de la presión coloidosmótica, lo que estaría relacionado con su relativamente bajo peso molecular y su gran carga neta.

En condiciones patológicas como pérdidas renales, desnutrición, infecciones prolongadas, etc., suelen presentarse hipoproteinemias, mientras que en otras como mieloma múltiple, endocarditis bacteriana y hemoconcentraciones de diversos orígenes, se observan hiperproteinemias.

En general, ambas situaciones se ven acompañadas también por hipoalbuminemias. Los aumentos anormales de albúmina son ocasionales y se relacionan casi siempre con deshidratación que produce el consecuente aumento en el contenido proteico del plasma.

FUNDAMENTOS DEL METODO

Determinación de Proteínas Totales:

Los enlaces peptídicos de las proteínas reaccionan con el ión cúprico, en medio alcalino, para dar un complejo color violeta con máximo de absorción a 540 nm, cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas totales en la muestra.

Determinación de Albúmina:

La albúmina reacciona específicamente -sin separación previa- con la forma aniónica de la 3,3',5,5'-tetrabromo cresolsulfon ftaleína (BCF), en presencia de un exceso de colorante, en medio tamponado a pH 3,8. El aumento de absorbancia a 625 nm respecto del Blanco de reactivo, es proporcional a la cantidad de albúmina presente en la muestra.

REACTIVOS PROVISTOS

A. Reactivo A: complejo EDTA/Cu 13 mmol/l en hidróxido de sodio 875 mmol/l y alquil aril poliéter (AAP).

B. Reactivo B: solución de 3,3',5,5'-tetrabromo cresolsulfon ftaleína (en polioxietilén lauril éter).

S. Standard (Suero Patrón): solución de albúmina y globulinas de origen bovino, con título conocido de proteínas y albúmina. Consultar los valores asignados en el rótulo, debido a que los mismos son lote específicos.

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Reactivos Provistos: listos para usar.

PRECAUCIONES

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro". Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de análisis clínicos.

Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

Reactivo A: corrosivo. H315 + H320: Provoca irritación cutánea y ocular. P262: Evitar el contacto con los ojos, la piel o la ropa. P305 + P351 + P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir enjuagando. P302 + P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes. P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Reactivos Provistos: son estables a temperatura ambiente (< 25°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

Standard: es estable a temperatura ambiente (no mayor de 25°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. Una vez abierto, debe conservarse en refrigerador.

INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

Variaciones en el pH de los reactivos pueden ocasionar su deterioro. Por este motivo se recomienda no intercambiar las tapas de los frascos.

Cualquier variación en los caracteres organolépticos del Standard puede ser indicio de deterioro del mismo.

MUESTRA

Suero

a) Recolección: debe obtenerse suero libre de hemólisis.

b) Aditivos: no se requieren.

c) Sustancias interferentes conocidas:

- En la determinación de Proteínas Totales no se observa interferencia por bilirrubina hasta 100 mg/l, ni hemólisis ligera y en ningún caso se presenta turbiedad por quilomicrones.

- En la determinación de Albúmina, no se observan interferencias por hemólisis moderada, bilirrubina hasta 200 mg/l ni lipemia hasta 20 g/l. Debido a que no interfieren las globulinas, en esta determinación no se requiere desproteinización previa. Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: si no se procesa inmediatamente el suero puede conservarse hasta 3 días en refrigerador (2-10°C) o una semana en congelador.

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Espectrofotómetro o fotocolorímetro.
- Micropipetas y pipetas para medir los volúmenes indicados.
- Tubos o cubetas espectrofotométricas.
- Baño de agua a 37°C (para Proteínas Totales).
- Reloj o timer.

• DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES

CONDICIONES DE REACCION

- Longitud de onda: 540 nm en espectrofotómetro o en fotocolorímetro con filtro verde (520-560 nm).
- Temperatura de reacción: 37°C
- Tiempo de reacción: 15 minutos
- Volumen de muestra: 50 ul
- Volumen de Reactivo A: 3,5 ml
- Volumen final de reacción: 3,55 ml

PROCEDIMIENTO			
En tres tubos marcados B (Blanco), S (Standard) y D (Desconocido), colocar:			
	B	S	D
Agua destilada	50 ul	-	-
Standard	-	50 ul	-
Muestra	-	-	50 ul
Reactivo A	3,5 ml	3,5 ml	3,5 ml
Mezclar con varilla. Incubar 15 minutos a 37°C. Leer en espectrofotómetro a 540 nm o en fotocolorímetro con filtro verde (520-560 nm) llevando a cero con el Blanco de Reactivo.			

ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCION FINAL

El color de la reacción es estable durante 12 horas por lo que la absorbancia debe ser leída dentro de ese lapso.

• DETERMINACION DE ALBUMINA

CONDICIONES DE REACCION

- Longitud de onda: 625 nm en espectrofotómetro o en fotocolorímetro con filtro rojo (620-650 nm).
- Temperatura de reacción: 15-28°C
- Tiempo de reacción: 10 minutos
- Volumen de muestra: 10 ul
- Volumen de Reactivo B: 3,5 ml
- Volumen final de reacción: 3,51 ml

PROCEDIMIENTO			
En tres tubos marcados B (Blanco), S (Standard) y D (Desconocido), colocar:			

	B	S	D
Standard	-	10 ul	-
Muestra	-	-	10 ul
Reactivo B	3,5 ml	3,5 ml	3,5 ml
Mezclar con varilla. Mantener los tubos entre 15 y 28°C durante 10 minutos. Leer en espectrofotómetro a 625 nm o en fotocolorímetro con filtro rojo (620-650 nm) llevando a cero con el Blanco de Reactivo.			

ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCION FINAL

El color es estable 20 minutos por lo que la absorbancia debe ser leída dentro de ese lapso.

CALCULO DE LOS RESULTADOS

Empleando el Standard tal como se indica en PROCEDIMIENTO, los cálculos se realizan como sigue:

$$\text{Proteínas Totales (g/dl)} = D \times f \quad f = \frac{\text{P.T. (g/dl)}}{S}$$

$$\text{Albúmina (g/dl)} = D \times f \quad f = \frac{\text{Alb. (g/dl)}}{S}$$

$$\text{Relación A/G} = \frac{\text{Albúmina (g/dl)}}{\text{P.T. (g/dl)} - \text{Alb. (g/dl)}}$$

Curva de calibración

Para constatar que el colorímetro tenga una respuesta lineal en las longitudes de onda fijadas para las reacciones, puede prepararse una curva de calibración con cantidades crecientes de Standard (ej.: 50 y 100 ul para Proteínas Totales; 10 y 20 ul para Albúmina) con un volumen de reactivo de 3,5 ml en todos los casos. Si los valores obtenidos para el segundo tubo se apartan más de un 5 % de los calculados de acuerdo a la lectura del primero debe emplearse para los cálculos la curva de calibración.

METODO DE CONTROL DE CALIDAD

Procesar 2 niveles de un material de control de calidad (**Standatrol S-E 2 niveles**) con concentraciones conocidas de proteínas totales y albúmina, con cada determinación.

VALORES DE REFERENCIA

Se determinó el contenido de proteínas totales y albúmina en suero de personas sanas, de ambos sexos, con alimentación mixta normal y edades entre 17 y 40 años; obteniéndose los siguientes rangos:

Proteínas totales: 6,1 a 7,9 g/dl
 Albúmina: 3,5 a 4,8 g/dl
 Relación A/G: 1,2 a 2,2

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CONVERSION DE UNIDADES AL SISTEMA SI

Proteínas totales (g/dl) x 10 = Proteínas totales (g/l)

Albumina (g/dl) x 10 = Albumina (g/l)

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.

- Determinación de Proteínas Totales:

Puede usarse plasma como muestra, pero el resultado de la proteinemia estará incrementado en 0,2 g/dl debido a la presencia de fibrinógeno, que no está considerado dentro de la definición de Proteínas Totales.

- Determinación de Albumina:

Mientras se realice la reacción entre 15 y 28°C puede utilizarse factor para los cálculos. Fuera de este rango, cambia la cinética de la reacción y no se completa el desarrollo del color.

El sistema debe estandarizarse con el Standard provisto, ya que los standards liofilizados y pools de sueros responden de distinta forma.

En caso de utilizar un analizador automático se recomienda, para una mejor performance, el empleo de **Albumina AA** de Wiener lab.

PERFORMANCE

a) Reproducibilidad: procesando replicados de las mismas muestras en distintos días se obtuvieron los siguientes resultados:

Proteínas Totales

Nivel	D.S.	C.V.
4,6 g/dl	± 0,023 g/dl	0,49 %
5,8 g/dl	± 0,023 g/dl	0,40 %
7,0 g/dl	± 0,029 g/dl	0,41 %

Albumina

Nivel	D.S.	C.V.
2,6 g/dl	± 0,079 g/dl	3,0 %
3,7 g/dl	± 0,071 g/dl	1,9 %
5,5 g/dl	± 0,070 g/dl	1,3 %

b) Recuperación: agregando cantidades conocidas de albumina y globulinas a distintas muestras se obtuvo una recuperación de 96 a 103% para Proteínas Totales y entre 98 y 100% para Albumina.

c) Límite de detección: depende del fotómetro empleado y de la longitud de onda. De acuerdo con la sensibilidad requerida para un ΔA mínimo de 0,001, el menor cambio de concentración detectable será de 0,02 g/dl para Proteínas Totales y 0,01 g/dl para Albumina.

d) Linealidad: la reacción es lineal hasta 12 g/dl para Proteínas Totales y hasta 6 g/dl para Albumina.

PRESENTACION

Equipo para 140 determinaciones de Proteínas Totales y Albumina con Standard (Cód. 1690001).

Wiener lab. provee separadamente:



Proti 2 Suero Patrón: frasco de 1,8 ml (Cód. 1690004).


BIBLIOGRAFIA

- Doumas, B.T.; Watson, W.A. & Biggs, H.G. - Clin. Chim. Acta 31/1:87 (1971).
- Gasbarro, L.; Bandinelli R. & Tomassini, G. - Clin. Chim. Acta 36:275 (1972).
- Pastewka, J. W. & Ness, A. T. - Clin. Chim. Acta 12:523 (1965).
- Peters, T. Jr. - Clin. Chem. 14:1147 (1968).
- Rojkin, M.L.; Olguín de Mariani, M.C.; Drappo, G.A. y Sosa, C.F. - Bioq. del Atlántico VI/63: 1931 (1974).
- Rojkin, M.L.; Olguín de Mariani, M.C.; Drappo, G.A. y Sosa, C.F. - Bioq. Clin. VIII/4:241 (1974).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4th ed., 2001.

Símbolos

Los siguientes símbolos se utilizan en todos los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab.

	Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"		Elaborado por:
	Representante autorizado en la Comunidad Europea		Nocivo
	Uso diagnóstico "in vitro"		Corrosivo / Cáustico
	Contenido suficiente para <n> ensayos		Irritante
	Fecha de caducidad		Consultar instrucciones de uso
	Límite de temperatura (conservar a)		Calibrador
	No congelar		Control
	Riesgo biológico		Control Positivo
	Volumen después de la reconstitución		Control Negativo
	Contenido		Número de catálogo
	Número de lote		

 Wiener Laboratorios S.A.I.C.
 Riobamba 2944
 2000 - Rosario - Argentina
<http://www.wiener-lab.com.ar>
 Dir. Téc.: Viviana E. Cétola
 Bioquímica
 Producto Autorizado A.N.M.A.T.
 Disp. N°: 1287/77-5349/98



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina