

Para la determinación cuantitativa de proteínas totales en orina y fluido cerebroespinal

SIGNIFICADO CLÍNICO

La presencia de proteína en la orina es un indicador muy sensible de desordenes renales. Existen cuatro causas por las cuales se incrementan las cantidades de proteína: permeabilidad glomerular incrementada; reabsorción tubular defectuosa; incremento en la concentración plasmática de una proteína anormal, de bajo peso molecular; y secreción anormal de proteínas dentro del tracto urinario. La albuminuria, cantidades aumentadas de albúmina en la orina, ha sido reconocida como un indicador temprano de daño renal en la diabetes que puede ser revertido si es detectado y tratado tempranamente. La medición de proteínas totales en el líquido cefalorraquídeo provee una indicación, ya sea de una permeabilidad aumentada de la barrera sangre/cerebro a las proteínas plasmáticas, o de una secreción intratecal aumentada de inmunoglobulinas

HISTORIA DEL MÉTODO

Varios métodos han sido descritos para la determinación de la concentración de proteínas en fluidos biológicos. Estos métodos están basados en procedimientos colorimétricos, turbidimétricos, electroforéticos o inmunológicos. Los métodos de unión a un colorante se caracterizan por tener una buena precisión y sensibilidad. El método de Azul coomassie es muy sensible, pero los reactivos manchan el material de laboratorio tanto de vidrio como de plástico.

Este método está basado en el procedimiento desarrollado por Fujita y Watanabe. Es un método colorimétrico con unión a un colorante, con buena sensibilidad, empleando rojo de Pirogalol. Este procedimiento raramente mancha las cubetas o la tubería de plástico y puede ser automatizado.

PRINCIPIO

El rojo de Pirogalol es combinado con ácido molibdenico a un pH bajo. Cuando el complejo se combina con la proteína, se desarrolla un color azul púrpúreo.

El incremento en la absorbancia a 600nm es directamente proporcional a la concentración de proteína en la muestra.

REACTIVOS

1.- REACTIVO DE MICROPROTEÍNA: Contiene buffer, 0.067mmol/L de Rojo de Pirogalol, molibdato de sodio como estabilizador, surfactantes y preservadores.

2.- SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE PROTEÍNA: Contiene 50 mg/dl de albúmina en solución salina con azida de sodio al 0.1% como preservador

El Reactivo de Microproteína y la Solución Estándar de Proteína son provistos listos para su uso.

ALMACENAMIENTO DE LOS REACTIVOS

Almacenar el Reactivo de Microproteína y la Solución Estándar de Proteína en refrigeración (2-8°C). Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad mostrada en las etiquetas.

PRECAUCIONES

1.- El Reactivo de Microproteína es exclusivamente para el diagnóstico *in Vitro*.

2.- Deberán seguirse las precauciones normalmente ejercidas para el manejo de reactivos de laboratorio.

3.- El Estándar de Proteína contiene azida de sodio. No lo ingiera. Puede reaccionar con el plomo o el cobre de la cañería para formar azidas metálicas altamente explosivas. Al desecharlo, lave con grandes cantidades de agua para prevenir la acumulación de azida.

DETERIORO DEL REACTIVO

El reactivo deberá estar claro. No lo utilice si el reactivo está turbio. La falla en alcanzar los valores del control al ser analizado pueden indicar deterioro. No lo emplee si la absorbancia del reactivo a 600nm es menor a 0.100.

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS Y ALMACENAMIENTO

Se recomienda que la recolección de muestras se lleve a cabo de acuerdo con el documento M29-T2 de la NCCLS. Las muestras que contengan partículas de materia visibles, deberán ser clarificadas por medio de centrifugación antes de su análisis.

ORINA: La prueba se lleva a cabo en muestras de 24 horas. La orina no deberá recolectarse durante periodos de ejercicio debido a su efecto en la concentración de albúmina. Las determinaciones deben realizarse con especímenes frescos. Si la prueba no puede llevarse a cabo con orina fresca, las muestras pueden ser almacenadas a -20°C hasta por un año.

FLUIDO CEREBRO ESPINAL: Debe evitarse la contaminación con sangre durante la recolección del FCE. Si la prueba no puede ser realizada inmediatamente, la muestra puede almacenarse a 2-8°C hasta por 72 horas, o a -20°C hasta por seis meses.

INTERFERENCIAS

Se recomienda no emplear muestras de orina con adición de preservadores dado que se ha demostrado que algunos de los preservadores añadidos, como el HCl y el ácido benzoico, interfieren en el análisis de la proteína, dando falso resultados (ver a Fujita).

MATERIAL

Reactivo de Microproteína

Solución Estándar de Proteína

MATERIAL REQUERIDO, NO SUMINISTRADO

Instrumentos para pipeteo precisos.

Tubo de ensayo, gradilla,

Baño maría o Parrilla eléctrica (37°C)

Cronómetro.

Espectrofotómetro capaz de leer a 600nm

PROCEDIMIENTO AUTOMATIZADO

Se encuentran disponibles aplicaciones para diversos equipos automatizados.

PROCEDIMIENTO (MANUAL)

- 1.- Etiquetar los tubos de ensaye como "Blanco", "Estándar", "Control" "Muestra", etc.
- 2.- Pipetear 1.0 ml del Reactivo de Microproteína en cada tubo.
- 3.- Permita a los tubos el alcanzar los 37°C
- 4.- Pipetear 0.02 ml (20 ul) de agua destilada, estándar, controles y muestras en los tubos adecuadamente marcados.
- 5.- Incubar los tubos a 37°C durante 5 minutos.
- 6.- Después de 5 minutos, programe el espectrofotómetro a 600 nm y fije el cero del aparato con el tubo marcado "Blanco".
- 7.- Lea y registre la absorbancia (Abs) del estándar, controles y muestras.
- 8.- Para determinar la concentración de Microproteína en las muestras, referirse a la sección "Cálculos".

CALIBRACIÓN

Utilizar un estándar de proteína acuoso.

CONTROL DE CALIDAD

Deberá aplicarse el programa de control de calidad de rutina a este procedimiento. Deben emplearse controles comercialmente disponibles de orina y FCE (2 niveles) para monitorear las variaciones diarias aceptables. Un satisfactorio nivel de desempeño se alcanza cuando los valores obtenidos del analito se encuentran dentro del rango aceptable establecido por el laboratorio.

CÁLCULOS

Los valores de proteína están expresados en mg/dl.

$$\text{Proteína (mg/dl)} = \frac{\text{Abs muestra}}{\text{Abs estándar}} \times \text{Concentración del standard}$$

Donde:

Abs. Muestra = La absorbancia de la muestra desconocida

Abs. Estándar= La absorbancia del estándar.

Conc. St. = Concentración del estándar (50 mg/dl).

Ejemplo:

Abs. Muestra = 0.085

Abs. Estándar= 0.195

Conc. St. = 50mg/dl

$$\text{Proteína (mg/dl)} = \frac{0.085}{0.195} \times 50 = 21.8 \text{ mg/dl}$$

Para determinar la Proteína Urinaria de 24 horas, mida el volumen total de la orina de 24 horas en ml (VT) y analice el contenido de proteína en la orina (mg/dl). Calcule la Protína Urinaria de 24 horas empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Proteína (mg/día)} = \frac{\text{Proteína (mg/dl)} \times \text{VT}}{100}$$

UNIDADES S.I.

Para convertir los resultados a unidades S.I., multiplique la concentración de la microproteína (mg/dl) por 0.0100. Por ejemplo:

$$\text{Concentración de microproteína} = 21.8 \text{ mg/dl} \times 0.0100 = 0.218 \text{ g/L}$$

VALORES ESPERADOS

Proteína Urinaria de 24 horas
Orina al azar

28 – 141 mg/día
Por debajo de 10 mg/dl

FCE (recién nacido)
FCE (adulto)

40 – 120 mg / dl
15 – 45 mg / dl

DESEMPEÑO

- 1.- Linealidad: El procedimiento para Microproteína es lineal hasta 250 mg/dl. Las muestras que excedan el límite de linealidad deberán ser diluidas con un volumen igual de solución salina isotónica y analizada nuevamente. Multiplicar el resultado por 2 para compensar la dilución.
- 2.- Sensibilidad: Basándose en una resolución de absorbancia del instrumento de 0.001, este procedimiento tiene una sensibilidad de 0.250 mg/dl.

FABRICADO POR:

POINTE SCIENTIFIC, INC.
E.E.U.U.
