



Protí 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 hipoalbuminurias. 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:

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

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

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

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 Albumina) 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 albumina, con cada determinación.

VALORES DE REFERENCIA

Se determinó el contenido de proteínas totales y albumina 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

Albumina: 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.

BIBLIOGRAFIA

- Dumas, 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.

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).



Protí 2

Método colorimétrico para a determinação de Proteínas Totais e Albumina em soro

SIGNIFICADO CLÍNICO

As proteínas são compostos orgânicos macromoleculares, amplamente distribuídos no organismo e essenciais para a vida. Atuam como elementos estruturais e de transporte e aparecendo como enzimas, hormônios, anticorpos, fatores coagulantes, etc.

A proteína que se encontra em maior quantidade é a albumina. Uma de suas funções mais importantes é a de permitir o transporte de ácidos graxos, hormônios esteroides, bilirrubina, catecolaminas, que em forma livre, são insolúvel em meio aquoso.

A concentração de albumina em plasma influi nos níveis de pressão coloidosmótica, que estaria relacionado com o baixo peso molecular e sua grande carga líquida.

Em condições patológicas como a perda renal, desnutrição, infecções prolongadas, etc., apresentam-se as hipoproteïnemias, não entanto, em outras como o mieloma múltiplo, endocardite bacteriana e hemoconcentrações de diferentes origens, observam-se as hiperproteïnemias.

Em geral, nas duas situações podem-se observar, também, as hipoalbuminemias. Os aumentos anormais de albumina são ocasionais e relacionam-se quase sempre com desidratação que produz como consequência o aumento no conteúdo protéico do plasma.

FUNDAMENTOS DO MÉTODO

Determinação de Proteínas Totais:

As ligações das proteínas reagem com o íon cúprico, em meio alcalino, para se obter um complexo de cor lilás com máximo de absorbância a 540 nm, cuja intensidade é proporcional à concentração de proteínas totais na amostra.

Determinação de Albumina:

A albumina reage especificamente -sem previa separação- com a forma aniônica da 3,3',5,5'-tetrabromo cresolsulfon ftaleína (BCF), em presença de um excedente de corante, em meio tamponado a pH 3,8. O aumento de absorbância a 625 nm em referência do Branco de reagente, é proporcional à quantidade de albumina presente na amostra.

REAGENTES FORNECIDOS

A. Reagente A: complexo EDTA/Cu 13 mmol/l em NaOH 875 mmol/l e alquil aril poliéter (AAP).

B. Reagente B: solução de 3,3',5,5'-tetrabromo cresolsulfon ftaleína (em polioxietilén lauril éter)

S. Padrão: solução de albumina e globulinas de origem bovino com título conhecido de proteínas e albumina. Consultar os valores assinados no rótulo, devido a que os mesmos são lote específicos.

INSTRUÇÕES DE USO

Reagentes Fornecidos: pronto para uso.

PRECAUÇÕES

Os reagentes são para uso diagnóstico "in vitro".

Utilizar os reagentes observando as precauções habituais de trabalho no laboratório de análises clínicas.

Todos os reagentes e as amostras devem ser descartadas conforme à regulação local vigente.

Reagente A: corrosivo. H315+H320: Provoca irritação cutânea e ocular. P262: Não pode entrar em contacto com os olhos, a pele ou a roupa. P305 + P351 + P338: SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar. P302 + P352: SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar com sabonete e água abundantes. P280: Usar luvas de protecção/ vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.

ESTABILIDADE E INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Reagentes Fornecidos: são estáveis sob temperatura (< 25°C) ambiente até a data do vencimento indicada na embalagem.

Padrão: é estável sob temperatura ambiente (não superior de 25°C) até a data do vencimento indicada na embalagem. Uma vez utilizado deve ser conservado sob refrigeração.

INDÍCIOS DE INSTABILIDADE OU DETERIORAÇÃO DOS REAGENTES

Variáveis no pH dos reagentes podem ser causa de deterioração, por este motivo recomenda-se não trocar as tampas dos frascos. Qualquer variável nos caracteres orgão-lépticos do Padrão pode ser indício de deterioração do mesmo.

AMOSTRA

Soro

a) Coleta: deve se observar que o soro esteja livre de hemólise.

b) Aditivos: não são necessários.

c) Substâncias interferentes conhecidas:

- Na determinação de Proteínas Totais não observam-se interferências por bilirrubina até 100 mg/l, nem hemólise ligeira, não apresentando-se turbidez em nenhum dos casos por quilomicrones.

- Na determinação de Albumina, não observam-se interferências por hemólise moderada, bilirrubina até 200 mg/l nem lipemia até 20 g/l. Não é necessária a desproteinização antes do ensaio posto que não tem interferência de globulinas.

Referência bibliográfica de Young para efeitos de drogas neste método.

d) Estabilidade e instruções de armazenamento: de não ser processado rapidamente o soro pode ser conservado sob refrigeração (2-10°C) até 3 dias ou uma semana congelado.

MATERIAL NECESSÁRIO (não fornecido)

- Espectrofotômetro ou fotocolorímetro.
- Micropipetas e pipetas para medir os volumes indicados.
- Tubos ou cubetas espectrofotométricas.
- Banho-maria a 37°C (para Proteínas Totais).
- Relógio ou timer.

• DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

CONDIÇÕES DE REAÇÃO

- Comprimento de onda: 540 nm em espectrofotômetro ou em fotocolorímetro com filtro verde (520-560 nm).
- Temperatura de reação: 37°C
- Tempo de reação: 15 minutos
- Volume de amostra: 50 ul
- Volume de Reagente A: 3,5 ml
- Volume final de reação: 3,55 ml

PROCEDIMENTO

Em três tubos marcados B (Branco), P (Padrão) e D (Desconhecido), colocar:

	B	P	D
Água destilada	50 ul	-	-
Padrão	-	50 ul	-
Amostra	-	-	50 ul
Reagente A	3,5 ml	3,5 ml	3,5 ml

Misturar com uma vara. Incubar 15 minutos a 37°C. Ler em espectrofotômetro (540 nm) ou fotocolorímetro com filtro verde (520-560 nm) zerando o aparelho com Branco de Reagente.

ESTABILIDADE DA MISTURA DE REAÇÃO FINAL

A cor é estável durante 12 horas devendo ler a absorbância dentro deste período de tempo.

• DETERMINAÇÃO DE ALBUMINA

CONDIÇÕES DE REAÇÃO

- Comprimento de onda: 625 nm em espectrofotômetro ou em fotocolorímetro com filtro verde (620-650 nm).
- Temperatura de reação: 15-28°C
- Tempo de reação: 10 minutos
- Volume de amostra: 10 ul
- Volume de Reagente B: 3,5 ml
- Volume final de reação: 3,51 ml

PROCEDIMENTO

Em três tubos marcados B (Branco), P (Padrão) e D (Desconhecido), colocar:

	B	P	D
Padrão	-	10 ul	-
Amostra	-	-	10 ul
Reagente B	3,5 ml	3,5 ml	3,5 ml

Misturar com uma vara. Manter os tubos entre 15-28°C durante 10 minutos. Ler em espectrofotômetro a 625 nm ou em fotocolorímetro com filtro verde (620-650 nm) zerando o aparelho com Branco de Reagente.

ESTABILIDADE DA MISTURA DE REAÇÃO FINAL

A cor é estável 20 minutos devendo ler a absorbância dentro deste período de tempo.

CÁLCULOS DOS RESULTADOS

Utilizando o Padrão segundo é indicado no PROCEDIMENTO, os cálculos devem ser realizados da seguinte maneira:

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

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

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

Curva de calibração

Para conferir o bom desempenho do aparelho linear nas comprimentos de onda fixadas para as reações, pode-se preparar uma curva de calibração com quantidades crescentes de Padrão (ex. 50 e 100 ul para Proteínas Totais; 10 e 20 ul para Albumina) com um volume de reagente de 3,5 ml em todos os casos. Se os valores obtidos para o segundo tubo fogem de 5% dos calculados conforme à leitura do primeiro deve ser utilizado para os cálculos a curva de calibração.

MÉTODO DE CONTROLE DE QUALIDADE

Processar 2 níveis de um material de controle de qualidade (**Standatrol S-E 2 níveis**) com concentrações conhecidas de proteínas totais e albumina, com cada determinação.

VALORES DE REFERÊNCIA

Foi determinado o conteúdo de proteínas totais e albumina em pessoas saudáveis, de ambos os sexos, com hábitos alimentares normais e idades entre 17 e 40 anos. Foram obtidos os seguintes dados:

Proteínas totais: 6,1 a 7,9 g/dl

Albumina: 3,5 a 4,8 g/dl

Relação A/G: 1,2 a 2,2

Recomenda-se que cada laboratório estabeleça seus próprios valores de referência.

CONVERSÃO DE UNIDADES AO SISTEMA SI

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

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

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Vide Substâncias interferentes conhecidas em Amostra.

- Determinação de Proteínas Totais:

Pode ser utilizado plasma como amostra, mas o resultado da proteinemia será incrementado em 0,2 g/dl pela presença de fibrinogênio, que não é considerado pela definição de Proteínas Totais.

- Determinação de Albumina:

Pode ser utilizado fator para os cálculos, sempre que a reação seja realizada com temperatura entre 15 e 28°C. Fora desta faixa, muda a cinética da reação e não é completo o desenvolvimento da cor.

O sistema deve ser padronizado com o Padrão fornecido, já que os padrões liofilizados e pools de soros respondem de diferentes maneiras.

Caso de utilizar um analisador automático recomenda-se, para um melhor desempenho, **Albumina AA** de Wiener lab.

- 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.

DESEMPENHO

a) Reprodutibilidade: processando duplicatas das mesmas amostras em diferentes dias obtiveram-se os seguintes resultados:

Proteínas Totais

Nível	D.P.	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

Nível	D.P.	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) Recuperação: adicionando quantidades conhecidas de albumina e globulinas a diferentes amostras obteve-se uma recuperação de 96 a 103% para Proteínas Totais e 98 a 100% para Albumina.

c) Limite de detecção: dependendo do fotômetro utilizado e da comprimento de onda, conforme com a sensibilidade necessária para um ΔA mínimo de 0,001, a menor mudança de concentração detectável será de 0,02 g/dl para Proteínas Totais e 0,01 g/dl para Albumina.

d) Linearidade: a reação é linear até 12 g/dl para Proteínas Totais e até 6 g/dl para Albumina.

APRESENTAÇÃO

Kit para 140 determinações de Proteínas Totais e Albumina com Padrão (Cód. 1690001).

Wiener lab, fornece por separado:

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

REFERÊNCIA

- Dumas, 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).



Proti 2

Colorimetric method for the determination of Total Proteins and Albumin in serum

SUMMARY

Proteins are macromolecular organic compounds widely distributed in the body and are essential for life. They act as structural and transport elements and also appear as enzymes, hormones, antibodies, coagulation factors, etc. Albumin is the most abundant protein in serum. One of its most important functions is to enable the transportation of fatty acids, steroid hormones, bilirubin, and catecholamines, which in their free form are not soluble in a water medium. Albumin concentration in plasma significantly influences on the stability of the colloid osmotic pressure, which is related to its relatively low molecular weight and its high net charge. Under pathological conditions such as renal loss, malnutrition, long-term infections, etc., hypoproteinemias may appear; while hyperproteinemias are observed with multiple myeloma, bacterial endocarditis and hemoconcentrations of diverse origins. Both situations are usually accompanied by hypoalbuminemias. Abnormal albumin increases are occasional and are mostly related with dehydration that produces the concomitant increase in the plasma protein content.

PRINCIPLE

Total Proteins Determination:

Protein peptidic bonds react with the cupric ion in alkaline medium, rendering a violet complex with a maximum absorption at 540 nm, being its intensity proportional to the total proteins concentration of the sample.

Albumin Determination:

Albumin specifically reacts -without previous separation- with the anionic form of the 3,3',5,5'-tetrabromo cresolsulfon phthalein (BCP), in the presence of an excess of dye in buffered medium at pH 3.8. The absorbance increase at 625 nm, related to the reagent Blank, is proportional to the albumin quantity present in the sample.

PROVIDED REAGENTS

A. Reagent A: 13 mmol/l EDTA/Cu complex in 875 mmol/l NaOH and alkyl aryl polyether (AAP).

B. Reagent B: 3,3',5,5'-tetrabromo cresolsulfon phthalein (BCP) solution (in polyoxyethylene lauryl ether).

S. Standard: bovine albumin and globulins solution with known proteins and albumin titers. Check the given values on the label, since they are lot specific.

INSTRUCTIONS FOR USE

Provided Reagents: ready to use.

WARNINGS

Reagents are for "in vitro" diagnostic use.

Use the reagents according to the working procedures for clinical laboratories.

The reagents and samples should be discarded according to the local regulations in force.

Reagent A: corrosive. H315+H320: Causes skin and eye irritation. P262 Do not get in eyes, on skin, or on clothing. P305 + P351 + P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. P302 + P352 IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water. P280 Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

STABILITY AND STORAGE INSTRUCTIONS

Provided Reagents: are stable at room temperature (< 25°C) until the expiration date shown on the box.

Standard: stable at room temperature (no higher than 25°C) until the expiration date shown on the box. Refrigerate after opening.

INSTABILITY OR DETERIORATION OF REAGENTS

Variations in the pH of the reagents may cause their deterioration. Do not exchange the bottle caps.

Any variation in the organoleptic characteristics of the Standard may indicate its deterioration.

SAMPLE

Serum

a) Collection: obtain non-hemolyzed serum.

b) Additives: not required.

c) Known interference substances:

- In Total Proteins determination no interferences from bilirubin up to 100 mg/l, nor from mild hemolysis are observed. Turbidity caused by chylomicrons has never been observed.
- In the Albumin determination no interferences from moderate hemolysis, bilirubin up to 200 mg/l nor from lipemia up to 20 g/l are observed. No previous deproteinization is required, since globulins do not interfere in this test.

See Young, D.S. in References for effect of drugs on the present method.

d) Stability and storage instructions: if the serum is not immediately tested, it can be stored up to 3 days in refrigerator (2-10°C) or a week in freezer.

REQUIRED MATERIAL (non-provided)

- Spectrophotometer or photocolormeter.
- Micropipettes and pipettes to measure the stated volumes.

- Tubes or spectrophotometric cuvettes.
- Water bath at 37°C (for Total Proteins).
- Stopwatch.

• TOTAL PROTEINS DETERMINATION

ASSAY CONDITIONS

- Wavelength: 540 nm in spectrophotometer or photocolormeter with green filter (520-560 nm).
- Reaction Temperature: 37°C
- Reaction Time: 15 minutes
- Sample Volume: 50 ul
- Reagent A Volume: 3.5 ml
- Final Reaction Volume: 3.55 ml

PROCEDURE

In three test tubes labeled B (Blank), S (Standard) and U (Unknown), place:

	B	S	U
Distilled Water	50 ul	-	-
Standard	-	50 ul	-
Sample	-	-	50 ul
Reagent A	3.5 ml	3.5 ml	3.5 ml

Mix with rod. Incubate for 15 minutes at 37°C. Read in spectrophotometer at 540 nm or in photocolormeter with green filter (520-560 nm) setting the instruments to zero O.D. with the Reagent Blank.

Mix with rod. Keep the tubes between 15 and 28°C for 10 minutes. Read in spectrophotometer at 625 nm or in photocolormeter with red filter (620-650 nm) setting the instruments to zero O.D. with the Reagent Blank.

STABILITY OF FINAL REACTION

The reaction color is stable for 20 minutes, thus readings should be performed within this period.

CALCULATIONS

Using the Standard as indicated in PROCEDURE, the calculations are performed as follows:

$$\text{Total Proteins (g/dl)} = U \times f \quad f = \frac{\text{T.P. (g/dl)}}{S}$$

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

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

CALIBRATION CURVE

To check that the colorimeter has a linear response in the wavelengths indicated for the reactions, a calibration curve can be prepared with increasing quantities of Standard (e.g. 50 and 100 ul for Total Proteins; 10 and 20 ul for Albumin) and a reagent volume of 3.5 ml in every case. If the value obtained for the second tube differs more than 5% from the ones calculated in reference to the first tube reading, the calibration curve must be used for the calculations.

QUALITY CONTROL METHOD

Each time the test is run, analyze two levels of a quality control material (**Standatrol S-E 2 niveles**) with known total proteins and albumin concentration.

REFERENCE VALUES

The contents of total proteins and albumin was determined in serum of healthy individuals of both sexes, with normal diet, ages between 17 and 40. The following ranges were obtained:

Total Proteins: 6.1 to 7.9 g/dl

Albumin: 3.5 to 4.8 g/dl

A/G Ratio: 1.2 to 2.2

It is recommended that each laboratory establishes its own reference values.

SI SYSTEM UNITS CONVERSION

Total proteins (g/dl) x 10 = Total proteins (g/l)

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

PROCEDURE LIMITATIONS

See Known interference substances under SAMPLE.

- Total Proteins Determination:

Plasma can be used as sample, but the result of the pro-

STABILITY OF FINAL REACTION

The reaction color is stable for 12 hours, thus readings should be performed within this period.

• ALBUMIN DETERMINATION

ASSAY CONDITIONS

- Wavelength: 625 nm in spectrophotometer or photocolormeter with red filter (620-650 nm).
- Reaction Temperature: 15-28°C
- Reaction Time: 10 minutes
- Sample Volume: 10 ul
- Reagent B Volume: 3.5 ml
- Final Reaction Volume: 3.51 ml

PROCEDURE

In three photocolormeter test tubes labeled B (Blank), S (Standard) and U (Unknown), place:

	B	S	U
Standard	-	10 ul	-
Sample	-	-	10 ul
Reagent B	3.5 ml	3.5 ml	3.5 ml

teinemia will be increased in 0.2 g/dl due to the presence of fibrinogen, which is not considered in the definition of the Total Proteins.

- Albumin Determination:

If the reaction is performed between 15 and 28°C a factor can be used for the calculations. Out of this range, the kinetic of the reaction changes and the color development is not completed.

The system should be standardized with the provided Standard, as lyophilized and serum pools respond in a different manner.

If an autoanalyzer is used in order to obtain a better performance, it is recommended to Wiener lab's **Albúmina AA**.

- 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.

PERFORMANCE

a) Reproducibility: when replicates of the same samples were assayed on different days the following results were obtained:

Total Proteins

Level	S.D.	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 %

Albumin

Level	S.D.	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) Recovery: by adding known quantities of albumin and globulins to different samples a recovery of 96 to 103% was obtained for Total Proteins and between 98 and 100% for Albumin.

c) Detection Limit: it depends on the photometer and the wavelength. According to the sensitivity required for a ΔA minimum of 0.001, the smallest detectable concentration change will be of 0.02 g/dl for Total Proteins and 0.01 g/dl for Albumin.

d) Linearity: the reaction is linear up to 12 g/dl for Total Proteins and up to 6 g/dl for Albumin.

WIENER LAB PROVIDES

Kit for 140 Total Proteins and Albumin tests with Standard (Cat. 1690001).

Wiener lab. separately provides:

Proti-2 Suero Patrón: 1 x 1.8 ml (Cat. 1690004).

REFERENCES

- Dumas, 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).

SÍMBOLOS // SÍMBOLOS // SYMBOLS

Símbolos que podrían encontrarse en los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab. // Símbolos que podem ser encontrados nos kits de reagentes para diagnóstico da Wiener lab. // Symbols that might be found on Wiener lab diagnostic reagent kits.



Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro" // Este produto preenche os requisitos da Diretiva Europeia 98/79 CE para dispositivos médicos de diagnóstico "in vitro" // This product fulfills the requirements of the European Directive 98/79 EC for "in vitro" diagnostic medical devices



Representante autorizado en la Comunidad Europea // Representante autorizado na Comunidade Europeia // Authorized representative in the European Community



Uso diagnóstico "in vitro" // Uso médico-diagnóstico "in vitro" // "In vitro" diagnostic medical device



Contenido suficiente para <n> ensayos // Conteúdo suficiente para <n> testes // Contains sufficient for <n> tests



Fecha de caducidad // Data de validade // Use by



Límite de temperatura (conservar a) // Limite de temperatura (conservar a) // Temperature limitation (store at)



No congelar // Não congelar // Do not freeze



Riesgo biológico // Risco biológico // Biological risks



Volumen después de la reconstitución // Volume após a reconstituição // Volume after reconstitution



Contenido // Conteúdo // Contents



Número de lote // Número de lote // Batch code



Elaborado por: // Elaborado por: // Manufactured by:



Nocivo // Nocivo // Harmful



Corrosivo / Cáustico // Corrosivo / Caústico // Corrosive / Caustic



Irritante // Irritante // Irritant



Consultar instrucciones de uso // Consultar as instruções de uso // Consult instructions for use



Calibrador // Calibrador // Calibrator



Control // Controle // Control



Control Positivo // Controle Positivo // Positive Control



Control Negativo // Controle Negativo // Negative Control



Número de catálogo // Número de catálogo // Catalog number



 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