

USO PREVISTO

El reactivo de proteína total en LCR/orina se utiliza para la determinación cuantitativa de la proteína total, mediante procedimiento manual o automatizado, en orina humana o líquido cefalorraquídeo.

INTRODUCCIÓN

La medición de la proteína en orina está adquiriendo importancia creciente en la detección de la patología renal¹. La proteinuria (aumento de proteínas en la orina) puede ocurrir debido al aumento de la permeabilidad glomerular, la reabsorción tubular defectuosa y la secreción anormal de proteínas en el tracto urinario². La albuminuria (aumento de albúmina en la orina) ha sido reconocida como un indicador temprano de daño renal en diabetes, que puede revertirse si se detecta y trata oportunamente³.

La medición de la proteína total en LCR y proteína específica se utiliza para detectar un aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (el endotelio capilar de los vasos del sistema nervioso central) a las proteínas plasmáticas o para detectar un aumento de la secreción intratecal de inmunoglobulinas¹.

PRINCIPIO

La prueba de proteína total en orina se basa en el procedimiento desarrollado por Watanabe et al⁴, que es un método colorimétrico de unión de colorante utilizando el complejo de rojo de pirogalol-molibdato, y modificado⁵ para igualar la reactividad de la albúmina y γ -globulina, y proporcionar buena precisión y linealidad.

El rojo de pirogalol se combina con ácido de molibdeno, formando un complejo rojo con absorción máxima a 467 nm. Cuando este complejo se combina con proteína en condiciones ácidas, se desarrolla un color azul-púrpura con un incremento en la absorción a 598 nm⁴.

COMPOSICIÓN DEL REACTIVO

1. Reactivo de Proteína CSF/Orina: 2.4 mg/dL de rojo de pirogalol, 0.96 mg/dL de molibdato de sodio y surfactantes en solución amortiguadora.
2. Estándar de Proteína CSF/Orina, 100 mg/dL: Albúmina de suero bovino en solución acuosa con 0.1% de azida de sodio como conservante probado durante la fabricación usando estándares trazables al Material de Referencia del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST) # SRM927a.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico in vitro.
2. Adopte precauciones universales requeridas para el manejo de todos los reactivos de laboratorio.
3. El estándar contiene azida de sodio. Puede reaccionar con tuberías de cobre o plomo para formar acumulaciones explosivas de azida metálica. Al desechar, enjuague con un gran volumen de agua.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD DEL REACTIVO

El reactivo y el estándar son estables hasta la fecha de vencimiento en la etiqueta, cuando se almacenan a 2-8°C.

DETERIORO DEL REACTIVO

1. No lo use si el reactivo aparece turbio o tiene precipitación.
2. No lo use si el reactivo no logra obtener resultados precisos.

MATERIALES PROPORCIONADOS

1. Reactivo de Proteína en LCR/Orina
2. Estándar de Proteína en LCR/Orina (100 mg/dL)

MATERIALES NECESARIOS PERO NO PROPORCIONADOS

1. Espectrofotómetro capaz de medir con precisión la absorbancia a 600 nm.
2. Tubos de ensayo con propiedades ópticas adecuadas para uso a 600 nm.
3. Dispositivos para pipetear con precisión 3,0 mL y 50 μ L
4. Incubadora capaz de mantener 37°C
5. Cronómetro
6. Tubos de ensayo/soporte

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

1. Se recomienda que la recolección de muestras se realice de acuerdo con el documento M29-T de NCCLS.
2. Se pueden utilizar muestras de orina al azar o de 24 horas (mantenga la muestra en hielo durante la recolección⁶). Se prefieren las muestras de la primera mañana para muestras al azar. Almacene a 2-4°C hasta por 24 horas. Estable congelado a -20°C hasta por 1 año. No se requieren conservantes⁶.
3. El LCR (lumbar) debe estar libre de hemólisis. Centrifugue antes del análisis. El LCR puede almacenarse a 4°C durante <72 horas. Estable a -20°C durante 6 meses, o a -70°C indefinidamente. Las muestras no deben contener sangre⁶.

SUSTANCIAS INTERFERENTES

1. Se recomienda no utilizar muestras de orina con conservantes añadidos, ya que algunos conservantes, como el HCl y el ácido benzoico, han demostrado interferir en el ensayo de proteínas, dando resultados falsos bajos⁴.
2. Algunos medicamentos pueden interferir, consulte Fujita et al⁷

PROCEDIMIENTO (MANUAL)

1. Ajuste la temperatura de la incubadora a 37°C.
2. Caliente el Reactivo de Proteína en LCR/Orina a 37°C.
3. Etiquete los tubos de ensayo: BLANCO, ESTÁNDAR, MUESTRA, etc.
4. Pipetee 3,0 mL de Reactivo de Proteína en LCR/Orina en todos los tubos.
5. Al tubo etiquetado BLANCO, agregue 50 μ L de agua. Al tubo etiquetado ESTÁNDAR, agregue 50 μ L de estándar. Al tubo(s) etiquetado(s) MUESTRA, agregue 50 μ L de muestra(s).
6. Mezcle todos los tubos por inversión y colóquelos en la incubadora (37°C) durante 10 minutos.
7. Después de 10 minutos, ajuste la longitud de onda del espectrofotómetro a 600 nm y la lectura de absorbancia a cero con BLANCO. (Rango de longitud de onda: 580-630nm)
8. Lea y registre la absorbancia de ESTÁNDAR y MUESTRA frente a BLANCO como referencia.
9. Para calcular la(s) concentración(es) de la(s) muestra(s), consulte la sección de CÁLCULOS.

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda que se incluyan controles en cada conjunto de ensayos. Se puede utilizar rutinariamente material de control comercialmente disponible con valores establecidos de proteína en LCR/Orina para el control de calidad. El valor asignado del material de control debe ser confirmado por la aplicación elegida. La falta de obtención del rango adecuado de valores en el ensayo del material de control puede indicar deterioro del reactivo, mal funcionamiento del instrumento o errores de procedimiento.

CALIBRACIÓN

Utilice el estándar acuoso de proteína (trazable al NIST n.º SRM927a) incluido en el kit para la calibración. La concentración de proteína total debe validarse comparándola con un estándar comercial. Para instrumentos automatizados, consulte las especificaciones de la aplicación correspondiente.

CÁLCULOS

Los valores se derivan de la siguiente ecuación:

$$\text{Proteína en orina (mg/24 horas)} = \frac{\text{Au/As} \times \text{Cs} \times \text{V}}{\text{o}}$$

$$\text{Proteína (mg/dL)} = \text{Au/As} \times \text{Cs}$$

Donde Au y As son los valores de absorbancia de la muestra desconocida y del estándar, respectivamente, Cs es la concentración del estándar (mg/dL) y V es el volumen de orina de 24 horas en dL.

Ejemplo:

$$\begin{aligned} \text{Proteína total en orina (mg/día)} &= 0,020 \times 100 \times 11 \\ \text{[24 horas]} &0,195 \\ &= 113 \text{ mg/día} \end{aligned}$$

LIMITACIONES PROCESALES

- Las muestras que superen el límite de linealidad (200 mg/dL) deben diluirse con un volumen igual de solución salina isotónica y repetirse el análisis. Multiplique el resultado por dos para compensar la dilución. En orina, el ejercicio intenso elevará el resultado (<250 mg/día). En bebés prematuros, ocasionalmente pueden observarse valores de proteína en el LCR >130 mg/dL.

NOTA: Si se desea una mayor sensibilidad para muestras normales o ligeramente elevadas, se puede utilizar una muestra de 100 µl (0,100 mL). En este caso, diluya el estándar con el mismo volumen de agua destilada o desionizada y utilícelo como estándar de 50 mg/dl en lugar del estándar de 100 mg/dl en la prueba.

VALORES ESPERADOS

| | |
|-----------------------|---------------------|
| LCR (recién nacido) | 40-120 mg/dL 6 |
| <1 mes) | 20-80 mg/dL 6 |
| >1 mes) | 15-40 mg/dL 6 |
| LCR (lumbar) (adulto) | 8-32 mg/dL 6 |
| Orina al azar | menos de 10 mg/dL 8 |
| Orina (24 horas) | 28-141 mg/día 8 |

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

- Linealidad: 0-200 mg/dL
- Sensibilidad: Basado en una resolución de absorbancia del instrumento de 0,001, este procedimiento tiene una sensibilidad de 0,58 mg/dL (DAbs. = 0,001).
- Comparación: Se realizó un estudio comparativo entre el procedimiento descrito (Y) y una técnica similar establecida (X) en un analizador químico Abbott VP. Las muestras de orina de 83 pacientes presentaron valores de 0,1 a 163,9 mg/dl, y las muestras de LCR de 79 pacientes presentaron valores de 4 a 139 mg/dl. El valor inferior del intervalo de confianza del 95 % (a 14 mg/dl) fue de 15,27 mg/dl. El valor superior del intervalo de confianza del 95 % (a 14 mg/dl) fue de 15,43 mg/dl.

| Muestra | Coefficiente de correlación | Tamaño de la muestra | Ecuación de regresión | Error total |
|---------|-----------------------------|----------------------|-----------------------|-------------|
| Orina | 0.995 | 83 | Y = 0,96X + 4,86 | 3.02 |
| LCR | 0.996 | 79 | Y = 0,95X + 4,86 | 2.20 |

- Precisión: Las pruebas se realizaron según la directriz NCCLS #EP5-T. Se utilizaron tres muestras de orina diferentes para los estudios de precisión intraensayo y entre ensayos. Cada muestra se sometió a 21 ensayos replicados para el estudio de precisión entre ensayos. Para el estudio de precisión intraensayo, cada muestra se sometió a cuatro ensayos replicados al día durante 5 días (un total de 20 ensayos).

| | Dentro de la carrera | | | De carrera a carrera | | |
|-------------------|----------------------|------|-------|----------------------|------|-------|
| | #1 | #2 | #3 | #1 | #2 | #3 |
| Media (mg/dL) | 7.41 | 56.1 | 114.6 | 7.04 | 60.3 | 114.1 |
| DE (mg/dL) | 0.30 | 0.8 | 0.9 | 0.68 | 0.9 | 1.0 |
| CV. (%) | 4.04 | 1.5 | 0.8 | 9.67 | 1.6 | 0.9 |
| Número de ensayos | 21 | 21 | 21 | 20 | 20 | 20 |

REFERENCIAS

- Carone FA, Peterson Dr., Oparil S, Pullman TN. Transporte tubular renal y catabolismo de proteínas y péptidos. *Kidney Int*; 16: 271-8; (1979). Teitz, N.W.: *Textbook of Clinical Chemistry*. W.B. Saunders Co. págs. 602-613 (1986). Viberti GC, Pickup JC, Jarrett RJ, Keon H. Efecto del control de la glucemia en la excreción urinaria de albúmina y β2microglobulina en diabéticos insulino dependientes. *N Engl J Med*; 300: 638-41 (1979). Watanabe N, Kamei S, Ohkubo A, et al. Proteína urinaria medida con un complejo de rojo de pirogalol-molibdato, manualmente y en un analizador automatizado Hitachi 726. *Clin Chem*; 32: 1551-4 (1986).
- Orsonneau J L, Douet P, Massoubre C, Lustenberger P, Bernard S. Un método mejorado de pirogalol rojo-molibdato para determinar la proteína urinaria total. *Clin Chem*; 35: 2233-6 (1989).
- Tietz, N.W.: *Guía clínica de pruebas de laboratorio*; 470-473 (1990).
- Fujita y, Mori I, Kitano S. Reacción de color entre el complejo de pirogalol rojo-molibdeno (VI) y la proteína. *Benseki Kagaku*; 32: 379-86 (1983).
- Tietz, NW: *Fundamentos de química clínica* (1976): 356, 358, 369.



06/2018