

1- Título práctica de laboratorio: PERFIL PROTEICO

2- OBJETIVOS

Generales:

- Determinar la proteína presente en algunas muestras de sangre y hacer inferencias diagnósticas sobre problemas nutricionales, enfermedad renal o enfermedad hepática de acuerdo a valores de referencia.

Específicos:

- Determinar proteína total (albúmina y globulina), presente en una muestra de sangre.
- Cuantificar urea contenida en una muestra sanguínea.
- Determinar el valor de creatinina en una muestra de sangre.

3- REFERENTES CONCEPTUALES

Como referentes conceptuales los estudiantes deberán consultar los siguientes tópicos:

- Estructura, clasificación y funciones de las proteínas sanguíneas.
- Importancia Diagnóstica de las proteínas séricas a determinar en esta práctica.
- Valores de referencia en el perfil proteico
- Relación fisiopatológica entre hipoproteinemia, hiperproteínemia y los aspectos nutricionales, compromisos renales y/o hepáticos.

4- MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

Materiales y equipos

- 1. Espectrofotómetro.
- 1. Baño de María a 37°C.
- Micropipetas para medir volúmenes de 10 µL y 1000 µL.
- Puntas para micropipetas.
- 1. Centrífuga.

Reactivos

- Kit PROTEÍNA TOTAL, UREA/BUN-COLOR y CREATININA de laboratorio BioSystems, para medir las concentraciones respectivas in-vitro.
- Muestra sanguínea (suero o plasma recogidos mediante procedimientos estándar).

Materiales que debe traer el estudiante

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> 1. Marcador indeleble. Toallas absorbentes. | <ul style="list-style-type: none"> 1. Cronómetro |
|--|---|

5- PROCEDIMIENTO

1. Determinación de proteína total.

- Sacar el reactivo para proteína de su empaque y permitir atemperarlo a temperatura ambiente, posteriormente, tomar 3 celdas (o tubos) y rotular con los nombres: **Blanco**, **Patrón** y **muestra**. Con las micropipetas apropiadas realice las siguientes mediciones de volúmenes.

	Blanco	Patrón	Muestra
Agua destilada	20 µL	--	--
Patrón Proteína (S)	--	20 µL	--
Muestra	--	--	20 µL
Reactivo (A)	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

- Agitar bien e incubar los tubos o celdas durante 10 minutos a temperatura ambiente (16-25°C) o durante 5 minutos a 37°C.
- Leer la absorbancia (A) del Patrón y de la Muestra a 545 nm frente al Blanco. El color es estable durante al menos 2 horas.

Realización de los cálculos.

- La concentración de proteína en la muestra se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de la muestra } C_m = \frac{A_{\text{muestra}}}{A_{\text{Patrón}}} \times C_{\text{patrón}}$$

Donde $C_{\text{patrón}}$ = verla en la etiqueta del vial el valor obtenido se encontrará en unidades g/L

2. Determinación de Urea

En primera instancia, se debe preparar algunos reactivos de trabajo:

a) Reactivo (A): Vaciar el contenido de un vial de Reactivo A2 en un frasco de Reactivo A1, posteriormente Homogeneizar. Si se requiere preparar otros volúmenes, mezclar en la proporción: 1 mL de Reactivo A2 + 24 mL Reactivo A1. Esta mezcla es estable 2 meses a 2-8 °C

b) El suero, plasma u orina recogidos mediante procedimientos estándar se debe diluir 1/50 con agua destilada antes del ensayo.

c) Tener presente que Reactivo (B) y el Patrón (S): Están listo para su uso.

Atemperar los reactivos a temperatura ambiente, posteriormente, tomar 3 celdas (o tubos) y rotular con los nombres: **Blanco**, **Patrón** y **muestra**. Con las micropipetas apropiadas realice las siguientes mediciones de volúmenes.

	Blanco	Patrón	Muestra
Patrón de Urea (S)	--	10 µL	--
Muestra	--	--	10 µL
Reactivo (A)	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Agitar bien y dejar durante 10 minutos a temperatura ambiente ó 5 minutos entre 16–25°C. Posteriormente pipetear			
Reactivo (B)	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

- Agitar bien y dejar durante 10 minutos a temperatura ambiente ó 5 minutos entre 16 – 25°C.
- Leer la absorbancia (A) del Patrón y de la Muestra a 600 nm frente al Blanco. El color es estable durante al menos 2 h.

Realización de los cálculos.

- La concentración de Urea en la muestra se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de la muestra } C_m = \frac{A_{\text{muestra}}}{A_{\text{Patrón}}} \times C_{\text{patrón}} \times F_{\text{dil}}$$

Donde $C_{\text{patrón}} = 50$; el valor obtenido se encontrará en unidades mg/dL de urea

F_{dil} = Factor de dilución de la muestra.

Si la muestra fue orina, $C_{\text{patrón}} = 2500$; el valor obtenido se encontrará en unidades mg/dL de urea.

3. Determinación de Creatinina.

- Sacar los reactivos de sus empaques y permitir atemperarlos a temperatura ambiente.
- Ahora, se preparan los reactivos de trabajo:
 - Mezclar volúmenes iguales de Reactivo A y de Reactivo B y posteriormente homogeneizar; esta mezcla es Estable 1 mes a 2-8°C.
 - Precalentar el Reactivo de Trabajo a 37°C
 - El suero, plasma u orina recogidos mediante procedimientos estándar se debe diluir 1/50 con agua destilada antes del ensayo.
 - Tener presente que Reactivo (S): Está listo para su uso.

Posteriormente, tomar 2 celdas(o tubos) y rotular con los nombres: **Patrón** y **muestra**. Con las micropipetas apropiadas realice las siguientes mediciones de volúmenes.

	Patrón	Muestra
Reactivo de trabajo	1,0 mL	1,0 mL
Patrón (S)	0,1 mL	--
Muestra	--	0,1 mL

- Agitar bien y luego de cada mezcla:
- Leer la absorbancia (A) del Patrón y de la Muestra a 500 nm después de 30 segundos (A1) y de 90 segundos (A2) (el tiempo que se tiene presente es el transcurrido desde realizada la mezcla).

Realización de los cálculos.

- La concentración de creatinina en la muestra se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de la muestra } C_m = \frac{(A_1 - A_2)_{\text{muestra}}}{(A_1 - A_2)_{\text{Patrón}}} \times C_{\text{patrón}} \times F_{\text{dil}}$$

El factor de dilución se debe tener en cuenta si se utiliza muestra de orina y si la densidad es superior a 1g/ml

6 PREGUNTAS DE PROFUNDIZACIÓN

1. Qué correlación existe entre la creatinina sanguínea y la depuración o clearance de creatinina?
2. ¿Qué es la ecuación de Gault y cuál su utilidad en clínica?
3. Determine el clearance renal de creatinina de una persona, sabiendo que posee creatinina sanguínea de 1,5 mg/dL?
4. De acuerdo al resultado anterior, la persona presenta compromiso renal? Argumente su respuesta.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. BioSystems S.A. Costa Brava, 30. 08030 Barcelona (Spain) 09/2014. Quality System certified according to EN ISO 13485 and EN ISO 9001 standards of creatinine.
2. Baynes J. Bioquímica Médica. 3a Ed. Editorial Elsevier. España; 2011.
3. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 4th ed. Burtis CA, Ashwood ER, Brunson DE. WB Saunders Co, 2005.
4. Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 4th ed. AACC Press, 2001.
5. Koolman J, Klaus-Heinrich Röhm K-H. Bioquímica Humana. 4 Ed. Editorial Médica Panamericana. Argentina; 2012.
6. Laguna J, Piña E. Bioquímica de Laguna. 6a Ed. Editorial Manual Moderno. México; 2007.
7. López J, Fernandez A. Fisiología del Deporte. 3a Ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires; 2006.
8. Pratt Ch. Bioquímica. 2 Ed. Editorial. Manual Moderno. México: 2008.