BIOMEDICA
Vol. 2, No. 1 – 1982

CUANTIFICACION NEFELOMETRICA DE PROTEINAS PLASMATICAS

CONDICIONES DE ESTANDARIZACION

MARYBEL AYALA.* MARIA CRISTINA MONTENEGRO,** MIGUEL A. GUZMAN.***

Se presenta un estudio de tipo experimental para establecer las condiciones óptimas necesarias en la determinación de las concentraciones de una proteína plasmática por un procedimiento inmunoquímico de nefelometría de rayos laser. Se cuantificó transferrina en suero de 39 voluntarios. Se encontró que las condiciones para esta técnica eran: incubación de 10 minutos, temperatura ambiental de 30°C, dilución de antisuero en solución salina tampón (SST) pH 7.4 con Polietilen-Glicol (PEG-6000) al 4%. Bajo estas condiciones la concentración de Transferrina en el suero de la población estudiada osciló en un rango de 186 - 406 mg/dl.

INTRODUCCION

La cuantificación individual de proteína plasmática por procedimientos inmunoquímicos ha constituído uno de los avances importantes de las últimas décadas (1, 2, 3). Dentro de estos procedimientos el nefelométrico, basado en los procesos turbidimétricos propuesto por Libby en 1938 adaptado por Gittin y Edelhoch en 1951 y Goldberg y Campbell como un procedimiento muy sensible (4), ha ganado gran aceptación en la actualidad con la introducción del sistema de nefelometría con rayos laser de He- Ne, lo cual convierte el sistema en un procedimiento muy sensible, capaz de determinar concentraciones mínimas de proteínas cuando estas se precipitan específicamente con su suero homólogo; midiéndose en forma casi inmediata la turbidez causada por la formación de complejos inmunes (5). Adecuadamente estandarizado el procedimiento puede ser de gran utilidad tanto para estudios de tipo clínico (6) como en la investigación biológica (7).

El presente trabajo se propuso, con el objeto de conocer las condiciones óptimas que deben guardarse para obtener resultados confiables y reproducibles en la cuantificación de proteínas plasmáticas por procedimientos inmunoquímicos cuando la determinación utiliza un sistema de nefelometría con rayos laser.

MATERIALES Y METODOS

MUESTRAS: Como proteína para el procedimiento piloto de estandarización se seleccionó la Transferrina por su facilidad de

* Bióloga, Unidad de Inmunología Clínica Grupo de Microbiología e Inmunología. Instituto Nacional de Salud. Bogotá.

** Química, Unidad de Inmunoquímica, Grupo de Microbiología e Inmunología. Instituto Nacional de Salud. Bogotá.

*** Jefe Sección Diagnóstico, Investigación y Referencia. Instituto Nacional de Salud. Profesor Asociado Facultad de Medicina de la Universidad Nacional. Bogotá.

aislamiento y purificación y la utilidad clínica actual de su cuantificación. La cuantificación se realizó sobre suero de cada uno de 39 voluntarios adultos, de 18 - 22 años de edad de uno y otro sexo.

ANTISUERO: Este fue obtenido en cabra por procedimiento de inoculación intradérmica repetida, evaluado y liofilizado como una preparación altamente purificada por la unidad de Inmunoquímica del INS.

EQUIPO: Las determinaciones Nefelométricas se realizaron en un equipo Behring (Behring Laser Nephelometer D-6230 Frankfurt) de rayos laser.

Cada uno de los 39 voluntarios fue interrogado para descartar sobre bases clínicas procesos patológicos. De cada uno de ellos se obtuvo por punción venosa una muestra de 10 ml. de sangre; luego de la retracción del coágulo se separó y centrifugó el suero guardándose a -70°C. hasta el momento de su procesamiento.

El antisuero antitransferrina obtenido en cabra, fue reconstituído con agua destilada de acuerdo a las instrucciones para el lote usado. La titulación específica para el procedimiento nefelométrico se hizo confrontando diluciones progresivas del antisuero a partir de 1:20 hasta 1:320 con un suero patrón para nefelometría (COSAU-03 Behring). Las diluciones de este patrón se realizaron desde 1:20 hasta 1:640. Una vez culminado el proceso se determinó la dilución óptima del antisuero que permitió construír una gráfica lineal de 6 puntos, básica para la cuantificación de los sueros a estudiar. Dicha curva se construyó graficando el logarítmo de la lectura nefelométrica contra el logarítmo de la concentración en mg/ml. Los sueros problemas y el suero control se diluyeron con solución salina tampón (SST) de fosfato 0.05 M pH: 7.4. Para aumentar la estabilidad de la reacción se vio la necesidad de disolver el antisuero antitransferrina en SST con polietilenglicol (PEG-6000 Sigma catálogo No. P 2139), esta mezcla se dejó en reposo un tiempo determinado antes de ser filtrado. Tanto la dilución del antisuero como las de cada suero en particular se pasaron por filtros Millipore (referencia 0.44 micrones) con el fin de eliminar partículas que pudiesen afectar la lectura dando resultados falsos.

La reacción se efectuó en cubetas ópticas (OVDI de Behring), a las cuales se les leyó previamente la luz refractada por la cubeta vacía, este valor se restó al resultado de la lectura de la reacción. En sendas cubetas se mezclaron 100 microlitros de cada una de las diluciones del suero patrón y de los sueros problemas con 200 microlitros, de la dilución óptima del suero antitransferrina. La reacción fue incubada a la temperatura óptima seleccionada, transcurrido el tiempo de incubación se hicieron las lecturas nefelométricas.

RESULTADOS

Se encontró que la titulación del antisuero es de capital importancia para encontrar una dilución óptima de trabajo. Como lo muestra la Figura No. 1 la zona óptima de equivalencia para una reacción medible nefelométricamente fue obtenida cuando el antisuero se diluyó 1:40. En la Figura No. 2 se observa cómo la dilución del antisuero en un diluyente como SST con concentraciones crecientes de PEG tiene una influencia notoria en la calidad de la reacción; habiéndose encontrado que una concentración de PEG del 4% es la óptima y que la reproducibilidad de los resultados es mejor si la dilución se prepara y se deja en reposo por un lapso no menor de 4 horas, luego de lo cual se filtra y se hace la prueba. Se encontró que el tiempo óptico de incubación del suero problema con la dilución apropiada del antisuero era de 10 minutos ya que en un tiempo mayor la reacción se vuelve inconsistente, como lo muestra la Figura No. 3.

Se halló que la reacción es muy sensible a las variaciones de temperatura ambiental, observándose que temperaturas por debajo de 30°C. tienden a negativizar la reacción; por tanto se concluyó que la temperatura ambiental del laboratorio para incubación y lectura de la reacción debe ser de 30°C. siendo realmente un factor crítico para el proceso como se ve en la Figura No. 4.

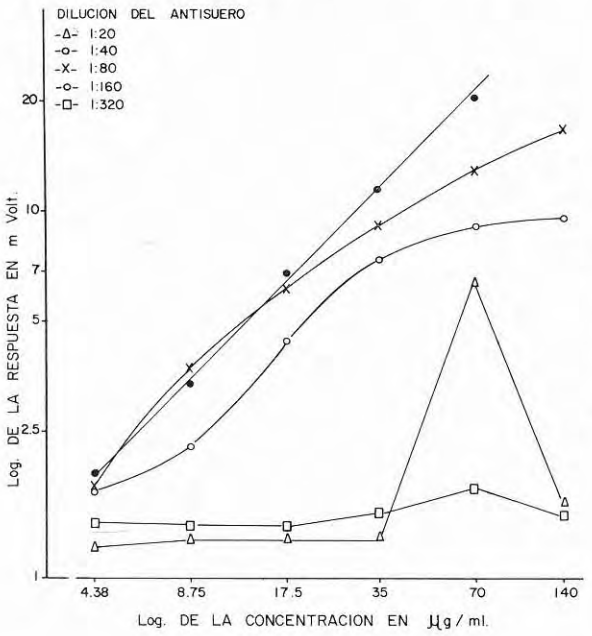

Fig. Nº 1. Efecto de la dilución del antisuero en el comportamiento de la reacción.

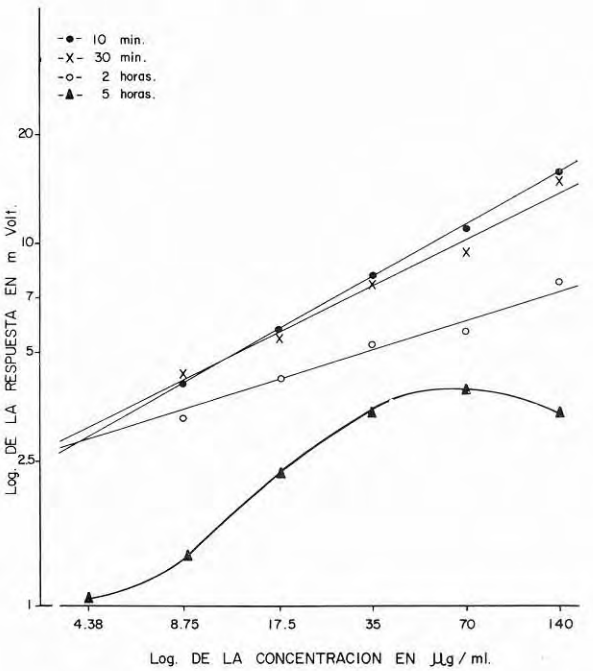

Fig. Nº 3. Comportamiento de la reacción Antígeno - anticuerpo con relación al tiempo de incubación.

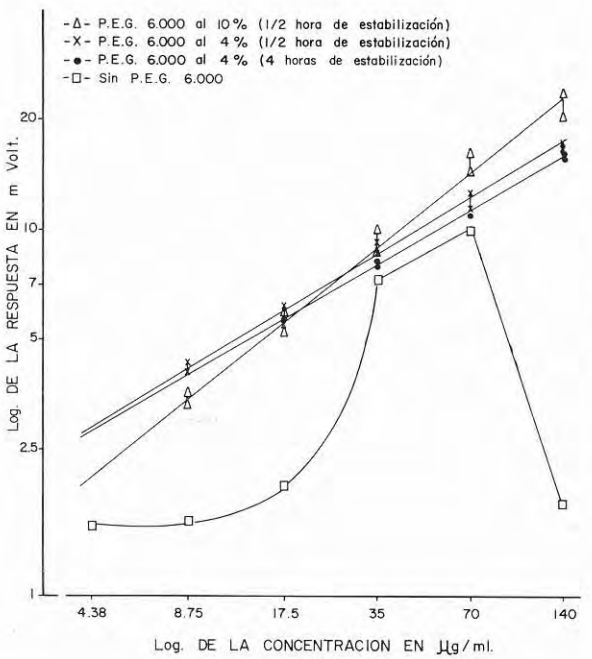

Fig. Nº 2. Efecto del P.E.G. 6.000 como estabilizador en la reacción Antígeno-anticuerpo en el análisis Nefelométrico.

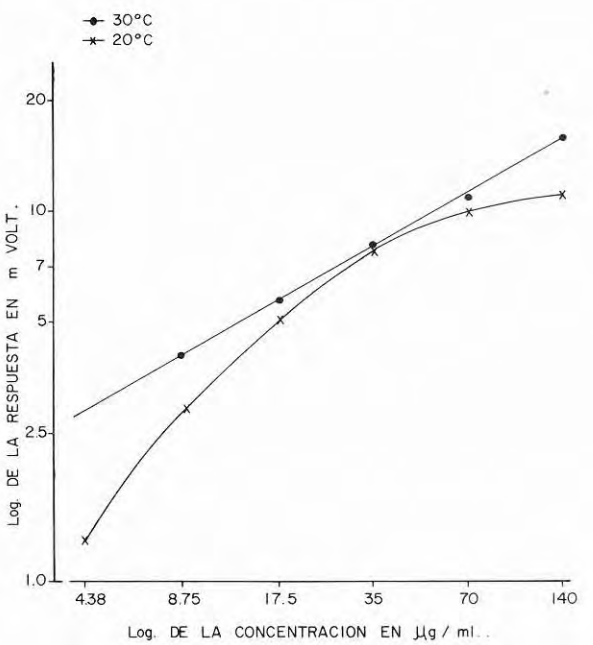

Fig. Nº 4. Efectos de la Temperatura ambiental sobre la reacción Antígeno-anticuerpo en la cuantificación Nefelométrica.

Para verificar que la curva patrón (logarítmo de la respuesta contra logarítmo de la concentración en mg/ml.) se ajustaba a una recta se empleó la prueba estadística de la linealidad basada en el análisis de varian-cias (Ley de Snedecor) (8).

Cuando la prueba se realizó en las condiciones derivadas del presente trabajo se encontró que los valores normales para la población analizada oscilaban entre 186-406 mg./dl. el análisis estadístico mostró que este hallazgo es coincidente con lo reportado en la literatura mundial con un procedimiento similar (Tabla No. 1). (6).

TABLA No. 1

COMPARACION DE LOS VALORES DE TRANSFERRINA HUMANA DETERMINADOS POR NEFELOMETRIA

	Datos del Trabajo	Datos de la Literatura (6)
Número de muestras	39	30
Rango normal mg./dl.	186-406	205-361
Variancia mg./dl.	55.06	39.00
Grados de libertad	39	29
F calculada	1.99	
F (0.01) tabulada	2.22	

DISCUSION

La determinación inmunoquímica de proteínas plasmáticas individuales es indudablemente un procedimiento ventajoso de gran utilidad clínica. El método nefelométrico aquí analizado tiene ventajas definidas en cuanto hace sencilla la realización de la prueba y permite obtener resultados muy rápidos frente a otros procedimientos como la doble inmunodifusión de Ouchterlony (1), la inmunodifusión radial de Mencini et al (3), o la electroinmunodifusión de Laurell (2). Sin embargo, la misma sensibilidad del sistema que utiliza rayos laser hace necesaria una estandarización muy rigurosa del sistema ya que, de otra manera, los resultados serían inconsistentes. Hemos encontrado que las técnicas descritas para los sistemas comerciales no siempre dan los resultados esperados, debiéndose por tanto estandarizarse para cada caso.

De los resultados del presente trabajo se establece que el antisuero debe utilizarse en una dilución apropiada y que esta dilución debe realizarse en una solución salina tampón que contenga 4% de polietilenglicol, mezcla que debe dejarse en reposo por un tiempo mínimo de 4 horas. La incubación por 10 minutos a temperatura ambiental de 30°C. y la lectura a esta misma temperatura constituyen los factores críticos que hacen la prueba confiable.

Respecto a la cuantificación de la *Transferrina*, se encontró que el procedimiento es sencillo y rápido y que la determinación coincide con lo hallado por otros autores, siendo por tanto confiable su determinación por el procedimiento nefelométrico aquí estandarizado. Una de las grandes desventajas del procedimiento nefelométrico de rayos laser es su alto costo por el tipo de equipo que usa y la necesidad de filtración de los sueros; sin embargo, la posibilidad de preparación a nivel local de nuestros propios reactivos convierte el sistema en un procedimiento versátil y de costos menores, frente a otros procedimientos comerciales.

SUMMARY

An experimental procedure of standardization for quantitation of plasma proteins by immunochemical nephelometric technique is presented. Transferrin was quantitated in 39 sera from healthy volunteers. It was found that optimal conditions included 10 minutes incubation time, room temperature of 30°C, dilution of antitransferrin serum in saline buffer solution pH 7.4 eith Polyethilen-Glycol al 4% concentration. It was found that under these conditions the normal Transferrin concentration of the tested population range from 186 to 406 mg/dl. result which es in agreement with other similar studies.

BIBLIOGRAFIA

1. Ouchtherlony O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. Prog. Allergy 1958; 5: 1.

2. Laurell CB. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarosa gel containing antibodies. Analytical Biochem. 1966; 15: 42.

3. Mancini G, Carbonara AD, Heremans JI. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodifusion. Int. J. Immunochem. 1965; 2: 235.

4. Putnam FW., The plasma proteins. Academic Press. 1975; pp 378.

5. Takashi N, Hiroaki K and Masayuki S. Competitive nephelometric immunoassay. Method for antiepiletic drug in patient blood. J. Immunol. Methods. 1979; 29: 85.

6. Dito WR. Rapid immunonephelometric quantitation of eleven serum proteins by centrifugal fast analyzer. J. Clin. Pathology. 1979; 71: 301.

7. Wood PJ, Cockett D and Manson P. A rapid and inexpensive laser nephelometric assay for plasma pregnancy specific B1-glycoprotein levels. Clin. Chim. Acta. 1978; 90: 87.

8. Domenech JM. Métodos estadísticos para investigadores. Ed. Herder., 1977. pp 258, 375, 560.