

Administración de expansores plasmáticos y determinación de proteína en orina

C. Peña Cañaveras, C. Martínez-Brú, R. Homs Serradesanferm, T. Planella Guarro, M. Cortés Rius.

Resumen

En algunas muestras de orina remitidas para cuantificación de proteína, se hallaron resultados discordantes entre la concentración de proteína en orina (rojo de pirogalol-molibdato) y la excreción urinaria de las proteínas específicas más significativas. El procesamiento de las mismas muestras por el método del azul brillante de Coomassie, demostró que la concentración de proteína era comparable a la suma de la concentración de las proteínas urinarias específicas. Sospechando la presencia en orina de una interferencia positiva para el método rojo de pirogalol-molibdato que no afectara al método del azul brillante de Coomassie, se realizó una exhaustiva revisión de las historias clínicas de los pacientes afectados. Como característica común destacaba el hecho de que a todos ellos se les había administrado Hemoce® (Behringwerke AG), un sustituto plasmático a base de una solución coloidal de polipéptidos obtenidos a partir de la gelatina, excretado en su mayor parte por los riñones vía filtración glomerular.

Como consecuencia de este hallazgo se estudió el comportamiento de varios métodos (rojo de pirogalol-molibdato, azul brillante de Coomassie, biuret y biuret modificado) para la determinación de proteína en orina frente a distintas diluciones de Hemoce®. Si bien el método del azul brillante de Coomassie no detectaba concentración alguna de proteína en las diluciones analizadas, los otros métodos estudiados detectaron diferentes concentraciones de proteína.

Introducción

Actualmente en el Servicio de Bioquímica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, la proteína en orina se determina por un método colorimétrico (rojo de pirogalol-molibdato) adaptado a un analizador Cobas Integra (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza). Para completar el estudio de la proteinuria, se determinan también proteínas marcadoras de lesión glomerular y tubular tales como albúmina, inmunoglobulina G y α_1 -microglobulina; en caso necesario se cuantifican también las cadenas ligeras kappa y lambda de inmunoglobulinas.

Desde la utilización del método rojo de pirogalol-molibdato

Summary

We recently observed discrepancies between results obtained in some urine samples, in the sense that total protein concentration, determined by pyrogallol red molybdate, was greater and did not agree with the sum of the concentration of specific urine proteins. When these samples were analyzed by the Coomassie brilliant blue method, we found that total protein concentration agreed with the rest of specific proteins. We thus thought of a positively interfering substance or drug on total protein with the pyrogallol red method which did not have any effect on the Coomassie brilliant blue method. An accurate revision of clinical anamneses revealed that such urines came from patients under plasma replacement therapy. In all cases, a commonly used plasma substitute (Hemoce®, Behringwerke AG) was administered. Hemoce® is a colloidal solution of polypeptides obtained from gelatin, mostly excreted through the kidneys via glomerular filtration.

Several dilutions of Hemoce® were then analyzed by various methods of urine protein quantitation. It was found that the Coomassie brilliant blue method did not detect any concentration of proteins whereas the others detected various concentrations in the solutions.

para la determinación de proteína en orina, se observaron, en algunas muestras, discrepancias entre el resultado de la medida de la concentración de proteína y la suma de las concentraciones de las diferentes proteínas específicas, no apreciándose esta discrepancia cuando se determinaba la concentración de proteína por el método del azul brillante de Coomassie (tabla I). Cabe destacar además, que en todos los casos en que la suma de las concentraciones de proteínas urinarias específicas no explicaba la concentración de proteína hallada, se descartó la presencia de mioglobina, de hemoglobina y de cadenas ligeras de inmunoglobulinas (1).

Una revisión exhaustiva de las historias clínicas puso de manifiesto que en todos estos casos se había administrado a los pacientes el expansor plasmático Hemoce®, (Behringwerke AG, Margburg, Alemania). El Hemoce® es un sustituto del plasma a base de polímeros polipeptídicos obtenidos de la gelatina, unidos por puentes de urea. Se presenta en forma de solución coloidal al 3,5 % listo para infusión.

El objetivo del presente trabajo es estudiar la posible influencia del expansor plasmático Hemoce®, en la determinación de proteína en orina cuantificada por diferentes métodos adaptados a distintos analizadores.

Servei de Bioquímica,
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau,
Barcelona.
Recibido: 23-9-98
Aceptado: 8-1-99

Tabla I. Descripción de las concentraciones urinarias de proteína, albúmina, inmunoglobulina G, α_1 -microglobulina y cadenas ligeras de inmunoglobulinas en pacientes a los que se había administrado Hemoce®

Sexo-Edad	Proteína RP (g/L)	Proteína CBB (g/L)	ALB (mg/L)	A1M (mg/L)	IgG (mg/L)	Cadenas Kappa (mg/L)	Cadenas Lambda (mg/L)
V 73 a	0,78	0,28	129,0	31,0	18,6	-	-
V 77 a	2,03	0,36	41,0	31,5	8,9	18,00	4,56
V 44 a	2,28	1,30	590,1	27,4	37,0	23,00	9,49
H 60 a	0,77	0,11	8,7	25,2	5,3	10,20	5,00
V 71 a	0,91	0,22	26,8	36,6	5,5	39,50	14,10
V 22 a	1,73	0,06	10,6	15,5	<3,8	<7,28	<4,03
H 82 a	1,31	0,16	37,0	20,6	6,7	11,10	5,91
H 15 a	1,50	0,31	57,0	29,4	6,9	13,00	7,46
H 67 a	1,11	0,13	12,4	13,8	<3,8	-	-
V 48 a	1,20	0,13	24,4	15,6	<3,8	7,28	4,03
H 61 a	1,90	0,13	26,6	16,3	4,6	<7,28	<4,03
V 17 a	1,86	0,44	64,0	33,9	9,9	8,59	6,43
V 76 a	2,25	1,49	678,0	23,5	123,0	-	-
V 17 a	1,19	0,13	7,4	12,9	<3,8	-	-
V 17 a	1,44	0,14	9,0	11,5	<3,8	<7,28	<4,03
V 9 a	1,83	0,41	29,1	101,0	4,8	33,20	20,90
H 83 a	0,48	0,22	7,4	43,2	<3,8	-	-
V 66 a	2,08	0,56	191,7	23,9	14,2	19,5	7,32
V 51 a	1,46	0,11	8,6	63,4	<3,8	-	-
V 86 a	1,03	0,33	105,1	10,6	32,8	-	-
H 81 a	0,62	0,05	6,9	8,1	<3,8	-	-

V : varón ; H : hembra; RP: rojo de pirogalol-molibdato; CBB: azul brillante de Coomassie; ALB : albúmina. A1M : α_1 -microglobulina. IgG : inmunoglobulina G

Material y métodos

Instrumentación y reactivos

Determinación de proteína en orina

Se utilizaron los siguientes métodos de determinación de proteína en orina y de proteína en suero adaptados a cuatro analizadores:

Biuret (Biuret, ref. No 1553852 Roche Diagnostics) adaptado a un analizador Hitachi 747 (Roche Diagnostics). Es un método espectrométrico en el que las proteínas en medio alcalino reaccionan con iones cobre para dar lugar a un complejo violeta que se mide a 546 nm.

Rojo de pirogalol-molibdato (Pyrogallol Red (PR)-molybdate complex, ref. COBAS INTEGRA Total Protein Urine/CSF 07.5723.3.) adaptado a un analizador Cobas Integra (Roche Diagnostics). Es un método espectrométrico en el que las proteínas se unen al complejo rojo de pirogalol-molibdato desplazando el máximo de absorbancia de 470 nm a 583 nm (2).

Azul brillante de Coomassie (Bio-rad protein assay; Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Alemania) adaptado a un analizador Cobas Fara II (Roche Diagnostics). Es un método espectrométrico en el que el colorante se une a los grupos amino protonizados de los aminoácidos de la molécula proteica, de manera que se desplaza el máximo de absorbancia desde 455 nm a 600 nm (3,4).

Biuret modificado (Vitros Clinical Chemistry slide PROT ref. 828431, Johnson & Johnson C.D.I., Rochester, EEUU) adaptado a un analizador Vitros-250 (ref. 8132086, Johnson & Johnson). La modificación emplea iones de cobre que se unen a las proteínas, dando como resultado la disociación del ión cúprico del complejo colorante azo-cobre. La disminución del complejo azo-cobre se mide por espectrometría de reflexión.

Estudio de otras proteínas urinarias

Hemoglobina: la hemoglobina se determinó por lectura espectrométrica directa a 577 nm, efectuando una corrección de

Allen a 560 y 595 nm, en un espectrómetro Uvikon 931 (Kontron Instruments, Basilea, Suiza).

Mioglobina: la mioglobina se determinó por inmunonefelometría en un nefelómetro BNII (Behringwerke AG) utilizando antisuero N Myoglobin Reagent (ref. OWIB; Behring).

Albúmina: la albúmina se determinó por inmunoturbidimetría en un analizador Cobas Integra (ref. 07 3767 4; Roche Diagnostics).

Inmunoglobulina G: la inmunoglobulina G se determinó por inmunonefelometría en un nefelómetro BNII utilizando antisuero Human-IgG (ref. OSAS 14/15; Behring).

α_1 -Microglobulina: la α_1 -microglobulina se determinó por

Tabla II. Comportamiento de los métodos estudiados frente a albúmina

Albúmina Concentración teórica (g/L)	Azul brillante de Coomassie (g/L)	Biuret modificado (g/L)	Rojo de pirogalol-molibdato (g/L)
5,0	*	5,96	5,07
4,5	*	4,64	4,72
4,0	*	4,18	4,10
3,5	*	3,46	3,63
3,0	*	3,21	3,01
2,5	*	2,94	2,51
2,0	*	2,40	2,04
1,5	1,69	1,65	1,55
1,0	1,21	0,95	1,00
0,50	0,69	0,32	0,44
0,25	0,32	<0,10	0,16
0,125	0,20	<0,10	0,06

* A estas concentraciones no se ha determinado la concentración de proteína por el método del azul brillante de Coomassie ya que exceden el límite de linealidad del procedimiento (2 g/L)

Tabla III. Comportamiento de los métodos estudiados frente a Hemoce®

Hemoce® Concentración teórica (g/L)	Rojo de pirogalol- molibdato Concentración observada (g/L)	Azul brillante de Coomassie Concentración observada (g/L)	Biuret modificado Concentración observada (g/L)	Biuret Concentración observada (g/L)
35	7,05	0	>12	29,70
17,5	5,35	0	>12	15,50
8,75	2,17	0	>12	8,0
4,38	1,60	0	5,98	4,0
2,19	1,00	0	2,34	2,10
1,10	0,54	0	0,64	0
0,55	0,26	0	0,61	0
0,27	0,12	0	0,17	0

inmunonefelometría en un nefelómetro BNII utilizando anti-suero α_1 -microglobulina (ref. OWLB; Behring).

Cadenas ligeras kappa y lambda: las cadenas ligeras kappa y lambda se determinaron por inmunonefelometría en un nefelómetro BNII utilizando antisueros anti kappa (ref. OWHG; Behring) y anti lambda (ref. OWHH; Behring)..

Procedimiento de estudio

Estudio del comportamiento frente a albúmina

Para el estudio del comportamiento de los diferentes métodos frente a albúmina, se preparó una solución de albúmina (Albumin V, ref. 12018; Merck, Darmstadt, Alemania) cuya concentración por el método del Biuret en un analizador Hitachi 747 fue de 50g/L. Se efectuó una dilución 1/10 de esta solución, y de ésta se prepararon doce diluciones para abarcar un intervalo de proteína desde 0,125 g/L hasta 5 g/L. Estas diluciones finales se analizaron por duplicado por los diferentes métodos citados anteriormente.

Estudio del comportamiento frente a Hemoce®

Se realizaron diluciones dobles de Hemoce®, a partir de la concentración inicial de 35 g/L, abarcando un intervalo de concentraciones desde 0,27 g/L hasta 35 g/L, y se determinaron por duplicado las concentraciones de proteína de dichas soluciones por los diferentes métodos citados anteriormente.

Resultados

Los resultados del comportamiento frente a albúmina de los diferentes métodos adaptados a los distintos analizadores, se muestran en la tabla II.

Los resultados obtenidos del análisis de las diluciones de Hemoce® por los diferentes métodos adaptados a los distintos analizadores se muestran en la tabla III.

Discusión

Todos los métodos estudiados mostraron un comportamiento similar frente a albúmina, obteniéndose concentraciones cercanas a las esperadas.

Como se puede observar de los datos presentados en la tabla III, los distintos métodos estudiados se comportan de diferente manera frente a Hemoce®. Los resultados demuestran que: 1) con los métodos del biuret, las concentraciones halladas se corresponden con las concentraciones teóricas de las diluciones de Hemoce® debido a que se valoran los enlaces peptídicos; 2) las diferencias de comportamiento aparecen con los métodos de unión a colorantes; con el método azul brillante de Coomassie no se observó ningún tipo de respuesta para ningun-

na de las diferentes diluciones de Hemoce® preparadas, mientras que con el método rojo de pirogalol-molibdato se detectaron concentraciones que variaron desde un 20% de la concentración esperada para los valores más elevados, hasta un 44-49 % para los valores inferiores.

No se puede afirmar que el Hemoce® actúe como una sustancia interferente en la determinación de proteína en orina por el método del rojo de pirogalol-molibdato ya que el Hemoce® en sí es una mezcla de polipéptidos. Sin embargo, y dado que la administración de Hemoce® puede conducir a la obtención de resultados erróneos en la determinación de proteína en orina, es necesario indicar en la solicitud la existencia de este tipo de tratamiento a fin de que el laboratorio pueda aplicar la metodología más adecuada.

Correspondencia:
C. Peña Cañaveras
Servei de Bioquímica
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
Avinguda Pare Claret 167
08025 Barcelona
E-mail : mcortes@sendanet.es

Bibliografía

- Peña C, Martínez-Brú C, Homs R, Planella T, Cortés M. Effect of plasma replacement therapy on determinations of urine protein concentration. *Clin Chem* 1998; 44: 359-60.
- Watanabe N, Kamei S, Ohkubo A, et al. Urinary protein as measured with a pyrogallol red-molybdate complex, manually and in a Hitachi 726 automated analyzer. *Clin Chem* 1986; 32: 1551-4.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
- Cortés Rius M, Blanco Vaca F, Mercé Muntañola J, Queraltó Compañó JM. Adaptación al RA-1000 del método Azul Brillante de Coomassie para la determinación de proteínas totales en orina. *Clin Chem Newsletter* 1987; 1-2: 20-2