

Evaluación de un procedimiento analítico que utiliza cloruro de bencetonio para medir la concentración de proteína en líquido cefalorraquídeo

M.A. Sebastián Gábaro, J.M. Martínez Cervera, J. Valero Politi, J. Riera Masgrau

Resumen

En este trabajo se evalúa la calidad analítica de un procedimiento de medida que permite determinar la concentración de proteína en líquido cefalorraquídeo. El método se basa en la medida por espectrometría de la turbidez producida en la reacción de las proteínas con el cloruro de bencetonio, y se verifica en el analizador automático BM/Hitachi 911.

Se estudia la imprecisión intraserial e interserial, el límite de detección, el intervalo analítico, la contaminación entre especímenes y la inexactitud relativa respecto al método de biuret.

Los resultados obtenidos muestran que el procedimiento estudiado es una alternativa válida para la determinación de la concentración de proteína en líquido cefalorraquídeo. Los coeficientes de variación intraserial son inferiores al 3% y los de variación interserial son inferiores al 6%. El intervalo analítico obtenido es 0,012 - 2,45 g/L. La constante de contaminación analítica entre especímenes es del 13,44% a una concentración de proteína en líquido cefalorraquídeo de 0,26 g/L. Es preciso realizar lavados adicionales para evitar los problemas de contaminación y la formación de depósitos de precipitados.

Introducción

La determinación de la concentración de proteína en líquido cefalorraquídeo presenta diversos problemas derivados del hecho de que las concentraciones son muy bajas y de que se trata de una mezcla compleja de albúmina, globulina y polipéptidos de masa molar pequeña. Se han descrito diversos métodos para su determinación, que pueden agruparse en métodos de unión a colorante y turbidimétricos. El Ponceau S (1), el azul brillante de Coomassie (2) y el rojo de pirogalol (3) pertenecen al primer grupo; entre los métodos turbidimétricos destacan los que utilizan ácido tricloroacético (4) y ácido sulfosalicílico (5). También se han utilizado los reactivos de biuret y Folin-Lowry, pero requieren la precipitación previa de las proteínas para eliminar el material no proteico capaz de interferir en la determinación.

Recientemente, Boehringer Mannheim/Hitachi ha comercializado un equipo de reactivos, basado en el método turbidimétrico que utiliza cloruro de bencetonio descrito por Iwata y Nishikase (6), para la determinación de la concentración de proteína en orina y líquido cefalorraquídeo en los analizadores automáticos BM/Hitachi.

Summary

The analytical performance of a protein measurement procedure in cerebrospinal fluid has been evaluated in this study. The method is based on the spectrometric measurement of the turbidity produced in the reaction between proteins and benzethonium chloride. The evaluation has been carried out in the automatic analyzer BM/Hitachi 911.

Within-run and between-run imprecision, detection limit, analytical range, sample carry-over and inaccuracy relative to biuret method have been studied.

The results obtained show that this procedure is a satisfactory alternative for the concentration measurement of protein in cerebrospinal fluid. Within-run coefficients of variation are lower than 3% and between-run coefficients of variation are lower than 6%. The obtained analytical range is 0,012 - 2,45 g/L. The sample carry-over constant is 13,44%, measured at a protein concentration in cerebrospinal fluid of 0,26 g/L. Additional washes are necessary to avoid sample carry-over and precipitation problems.

En el presente trabajo se evalúa este procedimiento, basándose en las directrices de la IFCC (7) y de la ECCLS (8), y se comparan los resultados con los obtenidos con el método de biuret, empleado habitualmente en nuestro laboratorio.

Material y métodos

Instrumentación

Todas las determinaciones se realizan con un analizador automático BM/Hitachi 911 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania).

En el estudio de la inexactitud relativa respecto al método de biuret se utiliza un analizador automático Astra 8 (Beckman, Brea, EEUU).

Reactivos

El equipo para la determinación de la concentración de proteína por el método del cloruro de bencetonio consta de dos reactivos, el reactivo 1, que contiene hidróxido de sodio 530 mmol/L y EDTA-Na 74 mmol/L, y el reactivo 2, que contiene cloruro de bencetonio 32 mmol/L, (Urinary/CSF Protein, Boehringer Mannheim Corporation, Indianapolis, EEUU; ref. 935000).

Para la determinación de la concentración de proteína en líquido cefalorraquídeo por el método de biuret se utiliza el reactivo «Total Protein Reagent» (Beckman; ref. 668704).

Servicio de Bioquímica Clínica. Hospital Prínceps d'Espanya. L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona.
Recibido: 19-9-94.
Aceptado: 15-2-95.

Calibradores

Para realizar la calibración no lineal del procedimiento de medida se precisan cinco calibradores (Preciset U/CSF Protein, Boehringer Mannheim Corporation; ref. 935005), que son soluciones acuosas de albúmina y γ -globulina humanas, en una proporción de 62,5 y 37,5% respectivamente. Las concentraciones de los calibradores son: 0,1 g/L, 0,2 g/L, 0,4 g/L, 0,8 g/L y 2,0 g/L.

Especímenes

Para el análisis de las distintas características analíticas se han utilizado especímenes de líquido cefalorraquídeo de pacientes y muestras de distintas concentraciones obtenidas diluyendo el material de control sérico (Moni-Trol® X Chemistry Control Level I y II, Baxter, Düringen, Suiza; ref. 160272 y 160273) con una solución de NaCl 0,15 mol/L.

Procedimiento

En primer lugar se incuban 15 μ L de espécimen con 250 μ L de reactivo 1, y posteriormente se añaden 100 μ L de reactivo 2, que produce turbidez al reaccionar con las proteínas. Cada incubación se realiza durante 5 minutos a una temperatura de 37 °C. La medida de la turbidez se realiza espectrométricamente a una longitud de onda de 505 nm.

Análisis estadístico

Para el estudio de la inexactitud se emplea el método de regresión lineal no paramétrica de Passing y Bablok (9).

Evaluación

Imprecisión

El estudio de la imprecisión se lleva a cabo con 4 concentraciones distintas obtenidas a partir de diluciones del material de control sérico (Moni-Trol® X Chemistry Control Level I, Baxter) con una solución de NaCl 0,15 mol/L. Para obtener la imprecisión intraserial se analizan 20 muestras de cada una de las 4 concentraciones en una misma serie analítica. La imprecisión interserial se determina mediante el análisis diario de una muestra de material de control, de cada una de las 4 concentraciones, durante 20 días.

Límite de detección

Para hallar el límite de detección se determina la concentración de proteína en 20 muestras de una solución de NaCl 0,15 mol/L analizadas en distintas series. Su valor se calcula como $\bar{x} + 3s$ de los resultados obtenidos (10).

Intervalo analítico

El estudio del límite superior del intervalo analítico se efectúa mezclando material de control sérico (Moni-Trol® X Chemistry Control Level II, Baxter) de elevada concentración de proteína con una solución de NaCl 0,15 mol/L en distintas proporciones, de forma que resulten 11 concentraciones distintas de proteína que se encuentran entre 0,60 g/L y 3,20 g/L. Se realiza la inspección visual de los resultados representados gráficamente (figura 1).

Inexactitud relativa

El cálculo de la inexactitud relativa del procedimiento evaluado respecto al de biuret, adaptado al analizador Astra 8 (Beckman), se realiza a partir de la determinación de la concentración de proteína en 128 especímenes, 50 de los cuales son especímenes de líquido cefalorraquídeo de pacientes y el resto es material de control con diferentes concentraciones de proteína.

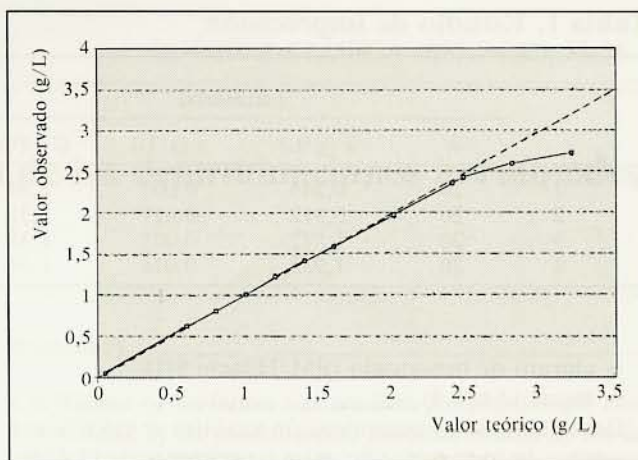


Figura 1. Estudio del intervalo analítico.

Contaminación entre especímenes

La contaminación analítica de los especímenes se determina analizando un espécimen de plasma, por tanto con una elevada concentración de proteína respecto al líquido cefalorraquídeo, seguido de tres muestras iguales (I_1, I_2, I_3) del material de control de baja concentración de proteína. La experiencia se repite diez veces.

Se calcula la constante de contaminación entre especímenes mediante la siguiente fórmula:

$$K = \frac{L_1 - L_3}{L_3} \cdot 100$$

donde L_1 es la media de los 10 resultados obtenidos al analizar el espécimen de baja concentración presumiblemente contaminado (I_1), es decir, el procesado inmediatamente después del espécimen plasmático, y L_3 la media de los 10 resultados del espécimen de baja concentración (I_3) analizado tras I_1 y I_2 , es decir, el espécimen teóricamente no contaminado.

El estudio de la contaminación entre especímenes se repite tras programar el analizador para que la pipeta de muestreo se lave especialmente con NaOH 1 mol/L antes de tomar la muestra de líquido cefalorraquídeo.

Resultados y discusión

Los resultados del estudio de la imprecisión intra e interserial se muestran en la tabla I. Los coeficientes de variación intraserial son inferiores al 3%, mientras que los de variación interserial no superan el 6%.

El límite de detección observado en esta evaluación es de 0,012 g/L.

El límite inferior del intervalo analítico se ajusta hasta el valor del límite de detección, y el límite superior, 2,45 g/L, es el observado en la inspección visual (figura 1). El intervalo de referencia de proteína en líquido cefalorraquídeo para los métodos turbidimétricos (11) tiene por límites inferior y superior los valores 0,15 g/L y 0,45 g/L, los cuales están incluidos en el intervalo analítico.

La comparación de la inexactitud, realizada con el método de Passing y Bablok, muestra diferencias sistemáticas constantes y proporcionales entre los dos procedimientos:

$$y = a + b x$$

$a = 0,021$; el intervalo de confianza (95%) es 0,010 - 0,033
 $b = 0,959$; el intervalo de confianza (95%) es 0,940 - 0,979

Tabla I. Estudio de imprecisión

	Intraserial				Interserial			
	<i>n</i>	\bar{x} (g/L)	<i>s</i> (g/L)	<i>CV</i> (%)	<i>n</i>	\bar{x} (g/L)	<i>s</i> (g/L)	<i>CV</i> (%)
1	20	0,246	0,007	2,84	1	0,260	0,015	5,77
2	20	0,812	0,011	1,35	2	0,849	0,040	4,71
3	20	1,572	0,021	1,33	3	1,615	0,065	4,02
4	20	1,932	0,026	1,34	4	1,959	0,070	3,57

y = cloruro de bencetonio (BM/Hitachi 911).
x = biuret (Astra 8).

Del estudio de la contaminación analítica se calcula una constante de contaminación entre especímenes de 13,44 %, a una concentración de 0,26 g/L. Al repetir el estudio incluyendo los lavados adicionales mencionados en el apartado «Material y métodos», se observa una constante de contaminación del 0 %.

Se constata que desde que se emplea este procedimiento analítico aparecen depósitos de precipitados en las cubetas de reacción y en el sistema de evacuación de desechos del analizador, que originan distintos problemas. Dichos depósitos dejan de formarse si se realizan lavados adicionales con HCl 0,2 mol/L de la cubeta de reacción en la que se ha determinado la concentración de proteína en líquido cefalorraquídeo.

Por otra parte, se producen dificultades en la calibración no lineal del procedimiento de medida, que desaparecen si a las pipetas de reactivos se les realiza un lavado adicional antes de tomar reactivos para la determinación de la concentración de proteína en líquido cefalorraquídeo. Este hecho podría indicar la existencia de contaminación entre reactivos, aunque, hasta el momento, no se ha objetivado de otro modo, ni se ha descubierto de qué reactivo o reactivos se trata.

Conclusiones

Se considera que el procedimiento evaluado es una alternativa válida para la determinación de la concentración de proteína en líquido cefalorraquídeo.

Se ha constatado que para evitar los problemas de contaminación analítica entre especímenes es preciso que el analizador realice un lavado adicional de la pipeta de muestreo con NaOH 1 mol/L.

Por otra parte, para evitar la formación de precipitados en las cubetas de reacción y sistema de desechos, y la posible contaminación entre reactivos, deben programarse lava-

dos con HCl 0,2 mol/L de las cubetas de reacción y de las pipetas de reactivos, respectivamente. Todos los lavados mencionados pueden ser programados para que el analizador los realice automáticamente.

Correspondencia:
M.A. Sebastián Gámbaro.
Servicio de Bioquímica Clínica.
Hospital Prínceps d'Espanya.
08907 L'Hospitalet de Llobregat (Barcelona).

Bibliografía

1. Pesce MA, Strande CS. A new micromethod for determination of protein in cerebrospinal fluid and urine. *Clin Chem* 1973; 19: 1265-7.
2. 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; 76: 248-54.
3. Watanebe N, Kamei S, Ohkubo A, Yamanaka M, Ohsawa S, Makino K et al. Urinary protein as measured with a pyrogallol red-molibdate complex, manually and in a Hitachi 726 automated analyzer. *Clin Chem* 1986; 32: 1551-4.
4. Cannon DC, Olitzky P, Inkpen JA. Proteínas. En: Richard J Henry, Donald C Cannon, James W Winkelman. *Química Clínica (Bases y técnicas)*. Barcelona: JIMS, 1980: 418-24.
5. Meulemans O. Determination of total protein in spinal fluid with sulfosalicylic. *Clin Chim Acta* 1960; 5: 757-61.
6. Iwata I, Nishikaze O. New micro-turbidimetric method for determination of protein in cerebrospinal fluid and urine. *Clin Chem* 1979; 25: 1317-9.
7. International Federation of Clinical Chemistry. Approved recommendation on quality control in Clinical Chemistry. Part 2. Assessment of analytical methods for routine use. *J Clin Chem Clin Biochem* 1980; 18: 78-88.
8. European Committee for Clinical Laboratory Standards. Guidelines for a user laboratory to evaluate and select a kit for its own use. ECCLS document Vol. 3, No. 3. Berlin: ECCLS, 1986.
9. Passing H, Bablok W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from the different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry. Part I. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983; 21: 709-20.
10. Fuentes-Arderiu X. Clarification paper on sensitivity, detectability, and limit of detection. *JIFCC* 1992; 4: 76-8.
11. Tietz NW. *Clinical guide to laboratory tests*. Filadelfia: WB Saunders Co., 1983: 416-8.