

PRÁCTICA TURBIDIMETRÍA

III. CUANTIFICACIÓN DE PROTEINURIA CON ÁCIDO SULFOSALICÍLICO

PROCEDIMIENTO

Fundamento

La adición de ácido sulfosalicílico a una solución de proteínas en baja concentración precipita las proteínas de una forma difusa, dando lugar a la aparición de un fino precipitado en suspensión. Este precipitado es visualizado como una opacidad blanquecina, es decir, como una turbidez cuya intensidad puede ser cuantificada espectrofotométricamente.

Cuanto más alta es la concentración de proteínas en la solución analizada, más intensa es la turbidez generada con el ácido sulfosalicílico y, por lo tanto, mayor es el bloqueo del paso de luz a través de la suspensión de precipitado. Este bloqueo se mide, espectrofotométricamente, en forma de absorbancia (A).

Este método turbidimétrico puede ser empleado para evaluar la cantidad de proteínas presente de una forma anómala en una orina.

Material necesario: 7 tubos de ensayo, 2 pipetas graduadas de 2 ml y 6 de 0,5 ml, 7 cubetas de medida espectrofotométrica, un espectrofotómetro que pueda medir a 660 nm, papel milimetrado, un lápiz y una regla.

Reactivos

- Suero fisiológico (solución acuosa de cloruro sódico a una concentración de 0,85 g/100 ml).
- Solución de ácido sulfosalicílico al 3%. Ésta se elabora de la siguiente forma:
 - Preparar 100 ml de una solución de sulfato sódico en agua destilada a una concentración de 7 g/100 ml.
 - Disolver 3 g de ácido sulfosalicílico en la solución de sulfato sódico previamente preparada.
 - Filtrar el reactivo preparado.
 - Resguardar el reactivo de la luz directa.
- Albúmina de sangre (por ejemplo, la proporcionada por los laboratorios Panreac). A partir de ella se han de elaborar unos patrones de la forma que se señala a continuación:
 - Preparar 10 ml de una solución de albúmina en suero fisiológico a una concentración de 0,7 g/100 ml.
 - Diluir la solución de albúmina preparada previamente del modo que se indica en el cuadro:

	Solución PATRÓN 1	Solución PATRÓN 2	Solución PATRÓN 3	Solución PATRÓN 4
Albúmina a 0,7 g/100 ml (en ml)	0,1	0,5	1	1,5
Suero fisiológico (en ml)	6,9	6,5	6	5
Dilución realizada	1/70	1/14	1/7	1/4,66
Concentración obtenida (en g/100 ml)	0,01	0,05	0,1	0,15

Muestra

- Orina. Si ésta está turbia, hay que filtrarla o, mejor aún, se centrifuga a 2 000 r.p.m. durante 5 minutos, y se utiliza el sobrenadante obtenido como muestra.

Técnica

1. Rotular dos tubos de ensayo con las siglas BR y BO (de Blanco de Reactivo y Blanco de Orina), cuatro tubos más con las siglas P1, P2, P3 y P4 (de Patrón 1, Patrón 2, Patrón 3 y Patrón 4) y un último tubo con las siglas PB (de Problema).

2. Rellenar los tubos rotulados previamente de la forma que se señala en el siguiente cuadro:

	Tubo Blanco de Reactivo (BR)	Tubo Patrón 1 (P1)	Tubo Patrón 2 (P2)	Tubo Patrón 3 (P3)	Tubo Patrón 4 (P4)	Tubo Blanco de Orina (BO)	Tubo Problema (PB)
Suero fisiológico	0,5 ml	-	-	-	-	2 ml	-
Solución Patrón 1	-	0,5 ml	-	-	-	-	-
Solución Patrón 2	-	-	0,5 ml	-	-	-	-
Solución Patrón 3	-	-	-	0,5 ml	-	-	-
Solución Patrón 4	-	-	-	-	0,5 ml	-	-
Orina problema	-	-	-	-	-	0,5 ml	0,5 ml
Ácido sulfosalicílico al 3%	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	-	2 ml

3. Agitar los tubos mediante inversión.

4. Transferir el contenido de los tubos a cubetas de medida espectrofotométrica.

5. Seleccionar la longitud de onda de 660 nm en el espectrofotómetro.

6. Dentro de los diez primeros minutos, contados desde el momento final de la preparación de los tubos, hay que leer la absorbancia del contenido de los tubos Patrón y Problema de la manera que se indica a continuación:

- En primer lugar, se debe ajustar el espectrofotómetro a 0 de absorbancia con el contenido del Blanco de Reactivo (BR) y, seguidamente, medir la absorbancia de cada uno de los patrones (P1, P2, P3 y P4). A esto se le llama lectura frente al blanco.
- Finalmente, es preciso ajustar el espectrofotómetro a 0 de absorbancia con el contenido del Blanco de Orina (BO) y, seguidamente, medir la absorbancia del Problema (PB).

VOCABULARIO

Interpolar: averiguar el valor de concentración a partir de un valor de absorbancia mediante el uso de una recta de calibrado. Para ello, se sitúa este valor de absorbancia en el punto que le corresponde en el eje de coordenadas donde están anotados los valores de absorbancia de los patrones y, seguidamente, se prolonga, en forma de rectas, primero hacia la recta de calibrado y después hacia el otro eje de coordenadas, donde están anotados los valores de concentración que corresponden a los patrones. Al hacer esto, la prolongación que viene del eje de las absorbancias incide en un punto del eje de las concentraciones cuyo valor es el de la concentración buscada.

Lectura de resultados

Con los resultados de absorbancia obtenidos en los patrones y los valores de concentración conocidos que les corresponde a cada uno, se ha de trazar una recta de calibración en papel milimetrado. Para ello, se anotan, en el eje de ordenadas o Y (el vertical), los valores de absorbancia obtenidos y, en el eje de abscisas o X (el horizontal), los valores de concentración conocidos. Posteriormente, se señalan en el gráfico los puntos en que confluyen cada valor de concentración y la absorbancia que se ha logrado con ella. Finalmente, se dibuja la recta que mejor una los puntos anteriormente señalados. Al hacer esto hay que tener en cuenta que se ha de procurar que todos los puntos estén en la recta o, al menos, equidistantes de ella.

Para determinar la concentración de proteínas en la orina problema se interpola* el valor de absorbancia obtenido con ella en la recta de calibrado realizada con anterioridad.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

En la orina normal no hay una cantidad apreciable de proteínas.

Se considera que hay trazas o indicios cuando se encuentra en la orina una concentración proteica comprendida entre los 0,005 y los 0,02 g/100 ml. Concentraciones superiores de proteínas en orina son consideradas como proteinuria significativa.