

Cátedra de Fisiología de la Facultad de Medicina de Barcelona
(Prof. Juan Jiménez Vargas)

Micrométodo para la determinación de las proteínas totales y cociente albuminas globulinas en 0,02 c. c. de suero

A. SOLS

Hay muchos métodos para la determinación de las proteínas totales del suero. También bastantes, aunque no tantos, para la del cociente albúminas-globulinas. A pesar de ello proponemos un nuevo método que reúne las siguientes ventajas:

Requerir tan pequeña cantidad de suero (0,02 c. c.) que, prácticamente, nunca habrá de dejarse la determinación por escasez de él.

Ser muy sencillo por la facilidad de su ejecución y precisar material corriente en los laboratorios clínicos.

Poderse realizar en sólo 10 a 15 minutos.

Ofrecer una seguridad semejante al tipo medio de los métodos que se utilizan en la práctica.

Fundamento

Se funda en diluir al 1/100 con solución de sulfato amónico semisaturada 0,02 c. c. de suero, obteniendo el volumen indispensable para poder comparar el enturbiamiento producido por la precipitación de las globulinas, con una suspensión de oxalato cálcico, en el colorímetro de Autenrieth o en uno de inmersión con cubeta estrecha. Por adición de clorhídrico pre-

opitan también las albúminas, comparándose el nuevo enturbiamiento con una suspensión más concentrada. La interposición de un cristal anaranjado facilita la comparación.

Método

Material. — 1. Pipeta mezcladora 0,02 a 2 c. c. (para la determinación de hemoglobina por el método de Autenrieth).

2. Colorímetro de Autenrieth (de preferencia con un cristal anaranjado en sustitución del mate que lleva el aparato).

Si no se dispone de este material, véase observaciones al final.

Reactivos. — 1. Solución de sulfato amónico a semisaturación. (Se prepara diluyendo un volumen de solución saturada clara con otro volumen de agua.)

2. Solución de cloruro cálcico al 0,35 % (de la sal anhidra) (= Weltmann 4).

3. Solución saturada de oxalato amónico ($\approx$ 4 %).

4. Acido clorhídrico diluido al 1/2 (Clorhídrico concentrado y agua a partes iguales).

Técnica. — Se pone en una cápsula pequeña o vidrio de reloj unos c. c. de solución de sulfato amónico semisaturada. Se aspira suero con la pipeta hasta el enrase 0,02 ; se sumerge la punta en la solución de sulfato amónico, manteniendo la pipeta lo más inclinada posible, y se aspira a la vez que se endereza la pipeta hasta el enrase de 2 c. c. Se tapan los extremos de la pipeta con los dedos pulgar y medio y se agita. A continuación se vierte totalmente su contenido en la cubeta del colorímetro (1).

En una probeta de 30 c. c. se ponen sucesivamente 10 c. c. exactos de la solución de cloruro cálcico, unos 2 c. c. de solución saturada de oxalato amónico y agua destilada hasta completar 30 c. c. Se mezcla y se llena la cuña (2).

Se compara haciendo tres lecturas para tomar la media si no difieren las extremas en más de 3-4 divisiones ; en caso

(1) El precipitado de globulinas a esta dilución tiene escasa tendencia a la sedimentación o floculación. Con todo es prudente, si transcurren más de 5 minutos, invertir varias veces o agitar antes de hacer la lectura.

(2) La suspensión de oxalato cálcico resultante tiene más tendencia a la sedimentación espontánea, por lo que no se hará ninguna lectura sin que haga menos de 4-5 minutos desde su preparación o última agitación. Por mucho tiempo que transcurra siempre puede regenerarse la suspensión homogénea por agitación.

contrario se hacen más lecturas y se toma la media del grupo predominante, descartando las desviaciones.

Después de esto se vacía la cuña y se vierten en ella 10 c. c. de la solución cálcica y 2 c. c. de oxalato amónico; se tapa e invierte varias veces para mezclar bien. Se coloca nuevamente en el colorímetro. Se saca la cubeta, se deja caer en su interior una gota de Cl H al 1/2 (1), se mezcla y se vuelve al colorímetro (2). Se hacen las lecturas en la forma expuesta.

Cálculo. — Escala nueva (el 100 en el máximo espesor de la cuña).

$$\frac{12 \times 1.^{\text{a}} \text{ lectura}}{30} = 0,4 \times 1.^{\text{a}} L = \text{grs. } \% \text{ de globulinas séricas.}$$

$$2.^{\text{a}} \text{ lectura} \times 1,02 = \text{grs. } \% \text{ de proteínas totales séricas.}$$

Escala antigua :

$$y \quad \frac{0,4 \times (100 - 1.^{\text{a}} L)}{(100 - 2.^{\text{a}} L) \times 1,02}, \text{ respectivamente.}$$

Proteínas totales — globulinas = albúmina.

$$\text{Albúmina} \times \frac{100}{\text{totales}} = \frac{A}{G} \text{ en } \% \text{ de totales.}$$

$$\text{Globulinas} \times \frac{100}{\text{totales}}$$

Casos extremos :

Puede ocurrir que las globulinas no se puedan comparar con la tipo por ser más opacas. Esto sucederá cuando haya más de 40 grs. $\%$ de globulinas, lo que no es muy frecuente. En este caso se prepara una nueva solución tipo con 10 c. c. de solución cálcica, 2 c. c. de solución saturada de oxalato amónico y 3 c. c. de agua, se compara y se calcula :

Escala nueva : $0,8 \times L = \text{grs. } \% \text{ de globulinas.}$

Escala antigua : $0,8 \times (100 - L) = \% \text{ de globulinas.}$

Así se pueden valorar hasta 80 grs. $\%$. Más de esto es sumamente raro. El autor sólo ha visto un caso (88 $\%$) en un enfermo de mieloma múltiple. También esta dificultad puede

(1) La pipeta utilizada debe dar 25-30 gotas por c. c.

(2) Aunque la estabilidad de esta suspensión es menor que la de las globulinas, vale lo dicho acerca de éstas.

solventarse — suponiendo que se presentase — utilizando como tipo la indicada para las proteínas totales que permite valorar hasta 100 grs. ‰.

Por otra parte puede ocurrir que no puedan compararse las «totales» con la tipo por haber más de 102 grs. ‰. Basta entonces añadir al contenido de la cubeta 1 c. c. de solución de sulfato amónico semisaturado (1), mezclar, leer y multiplicar la lectura (o su diferencia a 100, si ha lugar) por 1,53. Así pueden valorarse hasta 153 grs. ‰, límite que excede con mucho al de una proteinemia elevada, constituyendo la excepción hallazgo rarísimo.

Dado que la seguridad del método no alcanza como probable más que a las cifras de unidades ‰, sería completamente artificioso expresar los valores con decimales porque así resultara del cálculo, debiendo despreciarlos o tomar la unidad inmediatamente superior si es mayor de 0,5. Por lo demás, esta realidad afecta a la casi totalidad de los métodos de determinación de proteínas séricas, aun los macrométodos.

Observaciones

Damos el detalle de la técnica para el caso de disponer de la pipeta mezcladora y del colorímetro de Autenrieth. La primera puede sustituirse por una de 0,1 c. c. graduada con la que se toman 0,02 c. c. de suero que se añaden a 2 c. c. de solución de sulfato amónico semisaturada previamente colocados en la cubeta, lavándose su interior en la forma acostumbrada para tales pipetas. En este caso, se introduce en las fórmulas un factor de corrección de 1,02.

Si se utiliza un colorímetro de inmersión, la realización es análoga, resultando eventualmente más sencilla por no tener los topes que obligan en algunos casos a preparar nuevas suspensiones tipo. Por esta razón hemos preferido exponer el detalle de la técnica referido precisamente al caso más complejo del colorímetro de Autenrieth.

Para aplicar directamente las fórmulas (las correspondientes a «escala nueva») se coloca el problema a 10 mm. y se prescinde de la coma en la lectura.

(1) Adicionado previamente de 1 gota de clorhídrico al $\frac{1}{2}$ por cada 2 c. c.

Resumen

Se propone un micrométodo de determinación de proteínas y cociente albúminas globulinas en sólo 0,02 c. c. de suero. Su fundamento es la comparación del enturbiamiento producida por la precipitación sucesiva de las globulinas y albúminas por sulfato amónico y clorhídrico respectivamente, con suspensiones de oxalato cálcico de determinada concentración. No exige más de 10 a 15 minutos y es suficientemente preciso para la práctica clínica.

Summary

We propose a micromethod for determining proteins and the quotient of globulines albumines in only 0,02 cc. of serum. Its basis is the comparison of the turbidness produced by the successive precipitation of globulines and albumines by ammoniacal sulphate and chlorhydric acid, respectively, with suspensions of calcio oxalate of a determined concentration. It does not require more than 10 to 15 minutes and is sufficiently precise for clinical practice.

Zusammenfassung

Die Arbeit gibt eine Mikromethode zur Bestimmung von Eiweiss und dem Albumino-Globulin Quotient in nur 0,02 ccm. Serum. Ihre Grundlage ist der Vergleich der Trübung, die durch die Fällung ers des Globulins mit Ammoniumsulfat, und dann des Albumings mit Salzsäure eintritt, mit Suspensionen von Kalziumoxalat von bestimmter Konzentration. Das Verfahren dauert nicht länger als 10 bis 15 Minuten und es ist von ausreichender Genügkeit für den klinischen Gebrauch.