

Baza de cercetări științifice din Tîrgu Mureș a Academiei R.P.R.  
(director: Academician D. Miskolczy)

## O NOUĂ METODĂ SIMPLĂ, PENTRU DETERMINAREA PROTEINORAHIEI\*

Endre Kovács, Medard Kerekes, Márta Major

Cunoașterea proteinorahiei este de mare importanță pentru clinician: iată de ce există un număr atât de mare de metode pentru determinarea ei. Majoritatea acestora se bazează pe precipitarea proteinelor și pe măsurarea cantității precipitatului, fie prin metode gravimetrice sau nefelometrice, fie prin determinarea volumului său (*Sicard*). Alte metode se bazează pe colorimetrie și kjeldahlometrie. Ar fi de prisos să discutăm părțile pozitive și negative ale diferitelor metode dar trebuie să amintim neajunsul lor comun: cantitatea mare de lichid c. r. necesară și durata lungă a determinării. În afară de aceasta laboratoarele nu dispun de fotocolorimetre și balanțe corespunzătoare, necesare la determinările nefelometrice resp. gravimetrice, iar seriile etalon care înlocuiesc nefelometrul dau deseori rezultate eronate din cauza instabilității lor.

Lucrînd la electroforeza lichidului c. r. în laboratorul nostru, nu ne-am putut lipsi de cunoașterea proteinorahiei. Pentru determinarea acesteia am elaborat o metodă, care prin simplitatea ei și, mai ales prin cantitatea minimă de lichid c. r. necesară, e aplicabilă în laboratoarele clinice.

Principiul metodei e următorul: se pun pe hîrtie de filtru 20 microlitri (0,02 ml) de lichid c. r. proteinele se fixează pe hîrtie prin simplă uscare, apoi se colorează. După spălarea excesului de colo-

rant din hîrtie, proteinele apar în forma unei pete circulare colorate, al cărei diametru este proporțional cu cantitatea proteinelor.

Pentru determinare nu corespund toate hîrțiile de filtru. Cea mai potrivită în acest scop e hîrtia groasă fabricată la noi în țară, dar se poate întrebuița și hîrtie Schleicher-Schüll cu bandă neagră (cea cu bandă albastră nu corespunde). Condiția principală este ca proteinele să fie adsorbite în mod uniform pe hîrtie, dar nu prea energetic, deoarece în acest caz se obțin spoturi de forme neregulate. Compoziția soluției colorante este următoarea:

Albastru de bromfenol	0,1 g
Sublimat	5,0 g
Ac. acetic glacial	10,0 ml
Alcool etilic	90,0 ml

Înainte de determinarea propriu-zisă, se determină valorile etalon. Dintr-un ser (dacă e posibil normal) cu proteinemia cunoscută (care se determină prin metoda Kjeldahl, refractometrie sau cu sulfat de cupru) preparăm o soluție care conține 100 mg% proteine diluîndu-o cu ser fiziologic. 0,1 ml ser se diluiază la alțiia mililitri, cîte procente reprezintă conținutul în proteină. Din aceasta apoi preparăm (tot cu ser fiziologic) o serie de soluții, completînd 2,5—3,8—5,0 și 7,5 ml la 10 ml, obținînd o concentrație în pro-

\* Lucrare susținută la sesiunea științifică din dec. 1958 a Bazei de cercetări științifice din Tg.-Mureș a Academiei R.P.R.

teine e 25, 38, 50 și 75 mg%. După aceea măsurăm din fiecare soluție (inclusiv din cea de 100 mg%) câte 20 microlitri pe o bucată de hirtie de 18x4 cm la distanțe egale, fără ca spoturile umede să se atingă, în modul următor: se aspiră soluția în micropipetă, se ajustează nivelul soluției, se șterge vârful cu vată și apoi se așează ușor pe hirtia de filtru, care se ține în mîna stîngă în așa fel, încît nivelul lichidului din pipetă să fie la înălțimea ochiului. Se lasă să se scurgă încet 20 microlitri, apoi se așează hirtia pe o placă de sticlă și se ține la temperatura camerei pînă la uscare completă, ceea ce durează aprox. 20 de minute. Se poate usca și în etuvă la 110°, timp de 4—5 minute.

Hirtia uscată se pune într-o cutie Petri, se toarnă peste ea baia coloranta, se acoperă și se lasă timp de 20 de minute, după care colorantul se toarnă înapoi în sticlă, iar hirtia se spală de 3—4 ori cu apă distilată, eventual cu apă de robinet, pînă cînd colorantul dispăre complet din părțile care nu conțin proteină. Hirtia se pune apoi din nou pe placă de sticlă și se usucă. După uscare se ține deasupra unei sticle deschise cu amoniac pînă cînd pata devine albastră. Se măsoară diametrul fiecărei pete în milimetri. Dacă petele nu sînt complet circulare, se ia media aritmetică a diametrului celui mai mare și al celui mai mic. Intrucît aceste valori, care servesc ca etalon depind în mare măsură de calitatea hirtiei de filtru, determinările trebuie să se facă întotdeauna pe o hirtie de aceeași calitate cu hirtia pe care s-a stabilit și etalonul. Dacă întrebuițăm hirtii de altă calitate, etaloanele se vor determina din nou. În cazul hirtiei groase indigene am obținut următoarele valori:

Proteine mg%	Diametru mm
25	10
38	11,5
50	13
75	15
100	17

Pentru determinarea proteinorahiei se procedează în felul următor: se aduc 20 microlitri de lichid c. r. pe o bucată de hirtie de filtru de 3x3 cm. Dacă facem mai multe determinări se ia o fișie de hirtie de dimensiuni potrivite. Mai de-

parte se procedează ca mai sus. Măsurăm diametrul, scădem din el 2 mm, cifra obținută o comparăm cu valorile etalonului, aflînd astfel proteinorahia în mg%. E nevoie de această corecție deoarece lichidul c. r. dă un spot cu diametrul mai mare cu 2 mm decît soluția etalon de aceeași concentrație proteică, preparată din ser. Dacă se întrebuițează hirtie Schlercher-Schüll cu bandă neagră corecția este de 3 mm.

La o proteinorahie prea ridicată cînd spotul are diametrul (și după scăderea corecției) mai mare și culoarea mai închisă decît etalonul de 100 mg%, lichidul se diluează de 10 ori cu ser fiziologic și determinarea se repetă. Dacă presupunem de la început o proteinorahie ridicată, e bine ca determinarea să se facă în același timp cu lichid c. r. nediluat și diluat. Astfel se pot determina și valori între 100—1000 mg%.

Colorarea se poate face de altfel și cu alte soluții de coloranți, ca de ex. cu cele folosite la electroforeza pe hirtie. Notăm însă că albastrul de brominei este cel mai sensibil: cu acest colorant se pot decela pe hirtie chiar și 2 micrograme de proteine.

Metoda prezintă avantajul că executarea este simplă și rapidă, necesită o cantitate mică de lichid c. r. pretîndu-se bine la determinări în serie. Am comparat metoda aceasta cu metoda Sicard și am găsit o concordanță satisfăcătoare, fapt care se reflectă și în rezultatele de mai jos:

I.C.R.	Metoda cu pete.	Sicard mg%
1.	25	30
2.	sub 50	40
3.	sub 25	18
4.	25	30
5.	50	44
6.	25	30
7.	50	40
8.	sub 25	20
9.	sub 22	22
10.	sub 25	22
11.	38	30
12.	38	40
13.	25	22
14.	peste 50	56
15.	38	40
16.	38	40
17.	50	40

Sosit la redacție: 12 iulie 1959.