

Trabajo de investigación

## Comparación de tres métodos para cuantificar proteínas totales en sueros caprinos

### *Comparison of three methods to quantify total proteins in goat sera*

José Manuel Bottini\*<sup>2</sup>; Laura Simonetti<sup>1</sup>; Sabrina Peña<sup>1</sup>; Mercedes Ghibaudi<sup>1</sup>; Gustavo Lopez<sup>1</sup>;  
María Rovegno<sup>1</sup>; Micaela Fernández<sup>1</sup><sup>1</sup>Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Lomas de Zamora<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires. Chorroarín 280. CABA

e-mail: \*mbottini@fvet.uba.ar

(Recibido 22 de julio 2021; aceptado 22 de octubre 2021)

#### RESUMEN

La cuantificación de proteína sérica total permite determinar variaciones, y su aumento o disminución pueden ser asociados con distintos procesos patológicos. Existen varios métodos para su medición que difieren en cuanto a la necesidad de equipamiento, tiempo de medición y economía del procedimiento. Con el fin de seleccionar el método más adecuado para el trabajo a campo, se compararon tres procedimientos: espectrofotometría (KIT), refractometría digital (DIG) y manual (REF). Se muestrearon 85 cabritos de la raza Anglo Nubian en cuyos sueros se cuantificaron proteínas totales utilizando los tres métodos, y sus resultados fueron sometidos a análisis estadísticos evaluando el grado de asociación lineal, la concordancia y finalmente analizados mediante modelos lineales generales mixtos. La prueba de comparaciones múltiples permitió determinar que no existen diferencias entre los resultados obtenidos con KIT ( $5,86 \pm 0,09$  g/dl) y DIG ( $5,94 \pm 0,08$  g/dl) ( $p > 0,05$ ), pero sí entre REF ( $6,38 \pm 0,08$  g/dl) y los otros dos métodos ( $p < 0,05$ ). En base a los resultados obtenidos, se concluye que la espectrofotometría podría ser reemplazada por la refractometría digital para cuantificar proteínas totales en sueros caprinos. Esto nos permitiría utilizar en el trabajo a campo un método más sencillo, rápido y económico.

**Palabras clave:** proteínas totales, cabritos, espectrofotometría, refractometría.

#### INTRODUCCIÓN

Las proteínas séricas tienen múltiples funciones. La albúmina es la más osmóticamente activa y también es un importante transportador de muchas sustancias. Las globulinas son un grupo heterogéneo de proteínas, que incluyen los anticuerpos y otras moléculas inflamatorias, proteínas fibrinolíticas, hemostáticas y transportadoras de lípidos, vitaminas y hormonas<sup>1</sup>.

La determinación de proteína sérica total está indicada en la clínica para evaluar deshidratación,

#### ABSTRACT

The quantification of total serum protein allows the determination of variations, and its increase or decrease can be associated with different pathological processes. There are several methods for its measurement that differ in terms of the need for equipment, measurement time and economy of the procedure. In order to select the most suitable method for fieldwork, three procedures were compared: spectrophotometry (KIT), digital (DIG) and manual (REF) refractometry. 85 Anglo Nubian goats were sampled, serum total proteins were quantified using the three methods and their results were subjected to statistical analysis evaluating the degree of linear association, concordance and finally analyzed using mixed general linear models. The multiple comparison test allowed to determine that there are no differences between the results obtained with KIT ( $5.86 \pm 0.09$  g/dl) and DIG ( $5.94 \pm 0.08$  g/dl) ( $p > 0.05$ ), but between REF ( $6.38 \pm 0.08$  g/dl) and the other two methods ( $p < 0.05$ ). Based on these results, it is concluded that spectrophotometry could be replaced by digital refractometry to quantify total proteins in goat sera. This would allow us to use a simpler, faster and cheaper method in the fieldwork.

**Keywords:** total proteins, young goats, spectrophotometry, refractometry.

hiperhidratación, diarrea, pérdida de peso, nefropatías, hepatopatías y para confirmar la interpretación del valor del hematocrito<sup>2,3</sup>. Enfermedades como la parasitosis clínica o subclínicas pueden ocasionar hipoproteïnemia, y la gravedad del cuadro está dada en función de la carga de parásitos y la susceptibilidad del individuo<sup>3</sup>.

Si bien existen diversos métodos para medir proteínas totales, habitualmente se utiliza el método Biuret de Weichselbaum<sup>2</sup>. En una solución alcalina, los iones cobre se fijan a las uniones peptídicas de proteínas y péptidos, obteniéndose una coloración violeta, proporcional al

número de uniones peptídicas. Este método da como resultado distintas intensidades de color cuya lectura se realiza con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm<sup>2</sup>.

También se puede determinar la concentración de proteínas, de manera sencilla por refractometría, aunque los valores de concentración obtenidos podrían ser inferiores al método de Biuret<sup>2</sup>. La refracción es el fenómeno producido por el desvío de la luz cuando pasa a través de dos sustancias transparentes. Es el cambio de dirección y velocidad que experimenta una onda al pasar de un medio a otro con distinto índice refractivo<sup>4</sup>.

En condiciones de campo, como es la crianza de caprinos, contar con métodos que impliquen la utilización de elementos sencillos, económicos y rápidos para la determinación de valores de proteínas totales cobra mucha importancia.

El objetivo del presente trabajo fue comparar tres métodos: espectrofotometría y refractometría portátil (manual y digital) para determinar proteínas totales en sueros caprinos y seleccionar el que se ajuste a las necesidades para trabajo a campo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente ensayo se realizó siguiendo los requerimientos éticos del Comité Institucional para el cuidado y uso de animales de experimentación (CICUAE) de la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA), Universidad Nacional de Lomas de Zamora (UNLZ) (Resolución CA 123/17).

### Animales

Se utilizó el total de la población siendo esta de 85 cabritos (50 hembras y 35 machos), de 45 días de edad aproximadamente, de raza Anglo Nubian. Los mismos fueron criados en el Módulo de Experimentación, Capacitación e Investigación de Rumiantes Menores (FCA-UNLZ), ubicados en corrales con sector techado y sector abierto con una superficie por animal de 4 metros cuadrados, al pie de sus madres, bajo un sistema de lactancia natural, y suplementados a partir de su tercera semana de vida con balanceado iniciador (18 % de proteínas) más fardo de alfalfa, ambos ofrecidos *ad libitum*.

### Toma de muestras y procedimiento

La toma de muestras fue realizada en horas de la mañana sin ayuno previo.

Se extrajo sangre (3 ml) de la vena yugular con aguja 25/8 y se depositó la misma en tubo seco. Las mismas fueron colocadas a baño maría a 37°C durante 30 minutos, luego fueron centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos. En aquellos casos que presentaron hemolisis se repitió el procedimiento. Finalmente se obtuvieron los sueros para posterior lectura de proteínas totales. De cada suero, se tomaron alícuotas, las cuales fueron refrigeradas a 4°C para ser evaluadas mediante los tres métodos.

**Espectrofotometría (KIT):** Se utilizó un espectrofotómetro visible (Metrolab 1600 plus). Se trabajó con un reactivo comercial (PROTI 2, Lab. Wiener), con incubación a 37°C y posterior lectura por método colorimétrico a una longitud de onda de 540 nm. Los resultados se expresaron siguiendo las normas vigentes en bioquímica clínica<sup>2</sup>.

**Refractometría digital (DIG):** Se utilizó un refractómetro

digital (ARCANO); se usó agua destilada para su calibración, realizando la lectura una vez encendida la luz que ilumina el prisma. Luego, se cargó con la muestra de suero, activándose la medición y obteniendo el resultado en segundos<sup>4</sup>.

**Refractometría manual (REF):** Se utilizó un refractómetro manual (RHC-200ATC); se colocó una gota de suero sobre el prisma y luego se dirigió el instrumento hacia una fuente de luz, realizando la lectura en la escala de proteínas (SP), en el límite entre el campo claro (blanco) y el campo oscuro (azul).

La temperatura ambiente de la sala donde se realizaron todas las mediciones fue de 22 ± 2°C.

## Análisis estadísticos

Las concentraciones séricas de proteína cuantificadas según los tres métodos (KIT, DIG y REF) fueron inicialmente analizadas mediante estadística descriptiva, calculándose los valores promedio, desvío estándar (DS), mínimos, máximos y coeficiente de variación (CV).

Posteriormente, se determinó el grado de asociación lineal entre los resultados obtenidos por los tres métodos, mediante correlación de Pearson. La información se presentó mediante gráficos de dispersión y se detallaron los intervalos de confianza al 95%.

A los efectos de determinar la concordancia, es decir el grado de acuerdo entre los métodos de medición, se calcularon los coeficientes de correlación intraclass (CCI) según el análisis de fiabilidad (análisis de escala). La fuerza de concordancia según CCI se clasificó en las siguientes categorías<sup>5</sup>: pobre (<40 %), moderado (40-59 %), bueno (60-74 %) y excelente (>74 %). A su vez, se programaron gráficas de Bland-Altman<sup>6</sup>, calculándose los límites del acuerdo teniendo en cuenta 1,96 de las desviaciones estándar de las diferencias promedio entre los métodos comparados de a pares. Finalmente, los datos fueron analizados mediante modelos lineales generales mixtos contemplando al método como efecto fijo y a la muestra, como efecto aleatorio. Se usó la prueba DGC para comparaciones múltiples a posteriori. Todos los análisis fueron realizados con los programas INFOSAT (2021) y SPSS (2021).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se han evaluado tres métodos de cuantificación de proteínas totales utilizando sueros de cabritos criados al pie de sus madres. Distintas condiciones fisiológicas y/o patológicas pueden modificar los valores de proteínas totales. En los animales muestreados en este estudio debido a su temprana edad cobran importancia el estado nutricional y las parasitosis intestinales. Respecto del estado nutricional, este se relaciona con la concentración sanguínea de proteínas<sup>7</sup>. Por otra parte, dentro las parasitosis intestinales, la coccidiosis es la patogenia dominante y resulta altamente contagiosa produciendo diarreas, en algunos casos hemorrágicas, con signos de inapetencia, hipoproteinemia y deshidratación<sup>8</sup>, posibles de ser evaluados con la cuantificación de proteínas totales.

En la Tabla 1 se presentan los resultados de los estadísticos descriptivos para los tres métodos de cuantificación de la concentración sérica de proteína en cabritos. Los valores promedio se encuentran dentro del rango referido como normal para cabritos de esta edad, que ha sido definido entre 5 y 7 g/dl<sup>2</sup>. Dentro de los resultados obtenidos, algunos animales presentaron valores de proteínas totales inferiores (KIT: 3,61; DIG:

3,80; REF: 4,60) y otros superiores (KIT: 9,15; DIG: 7,90; REF: 8,20) a dicho rango referencial. Sin embargo, en ninguno de los casos se observaron cuadros clínicos compatibles con una deficiencia nutricional o parasitosis intestinal. Es de considerar que los animales jóvenes tienen un contenido proteico en suero menor que en los adultos<sup>2</sup>.

Si bien Kraff y Dürr<sup>2</sup> mencionan que los valores obtenidos por refractometría son inferiores al método de Biuret, en nuestro caso son ligeramente superiores (Tabla 1). A su vez, al calcular el CV de una misma muestra sometida a los tres métodos, el promedio fue de 6,23%, variando entre 1,73 y 18,70%. El CV promedio para una misma muestra evaluada por dos métodos fue: 4,53% (entre 0,12 y 22,76%) para KIT-DIG, 7,26% (entre 0,11 y 25,32%)

para KIT-REF y 5,16% (entre 1,27 y 16,27%) para REF-DIG. Cabe aclarar que sólo 1 y 2 muestras superaron un 20 % de CV para las duplas KIT-DIG y KIT-REF, respectivamente.

En la literatura científica se han propuesto varios métodos estadísticos para evaluar muestras analizadas por distintos operarios, metodologías o equipos de una misma metodología<sup>9,10</sup>. Tradicionalmente, se ha utilizado el coeficiente de correlación lineal de Pearson para comparar entre dos métodos de medición. Como se observa en la Tabla 2, se obtuvieron correlaciones significativas ( $p < 0,0001$ ) entre todos los métodos testeados de a pares, siendo más alto el coeficiente de correlación entre los métodos REF y DIG ( $r = 0,96056$ ). Los límites inferior y superior del intervalo de confianza

**Tabla 1:** Estadísticos descriptivos para tres métodos de cuantificación de la concentración de proteína (g/dl) en sueros de cabritos (n=85)

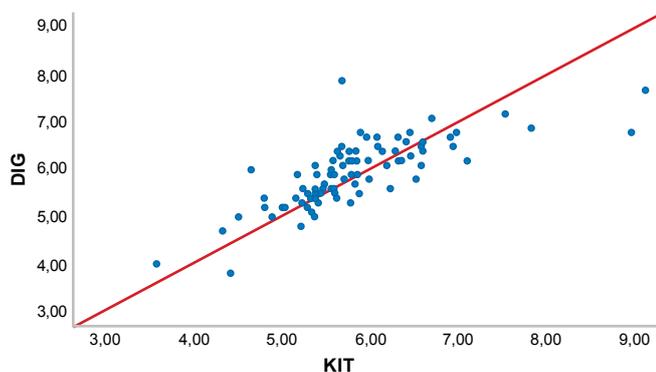
Método	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)	Mínimo	Máximo
KIT	5,86	0,86	14,59	3,61	9,15
DIG	5,94	0,71	11,88	3,80	7,90
REF	6,38	0,72	11,25	4,60	8,20

KIT (espectrofotometría); DIG (refractometría digital); REF (refractometría manual)

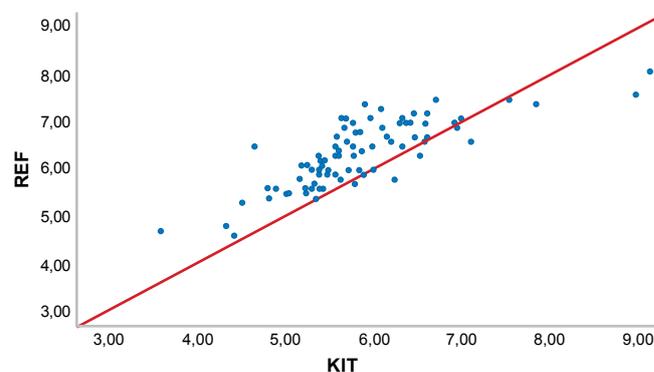
**Tabla 2:** Correlaciones (método de Pearson) entre los tres métodos de cuantificación de la concentración de proteína en sueros de cabritos (n=85)

	KIT	DIG	REF
KIT	1	0,75990 (<.0001)	0,75794 (<.0001)
DIG		1	0,96056 (<.0001)
REF			1

KIT (espectrofotometría); DIG (refractometría digital); REF (refractometría manual)



**Figura 1:** Gráfico de dispersión entre los métodos KIT y DIG de cuantificación de la concentración de proteína en sueros de cabritos (n=85). KIT (espectrofotometría); DIG (refractometría digital)



**Figura 2:** Gráfico de dispersión entre los métodos KIT y REF de cuantificación de la concentración de proteína en sueros de cabritos (n=85). KIT (espectrofotometría); REF (refractometría manual).

**Tabla 3:** Coeficiente de correlación intraclass (CCI) entre los tres métodos de cuantificación de la concentración de proteína en sueros de cabritos (N=85)

Métodos	CCI	Categoría*
KIT - DIG	0,74457	EXCELENTE
KIT - REF	0,6136	BUENO
DIG - REF	0,80393	EXCELENTE

KIT (espectrofotometría); DIG (refractometría digital); REF (refractometría manual). \*Categorías según Fleiss (1981)<sup>5</sup>

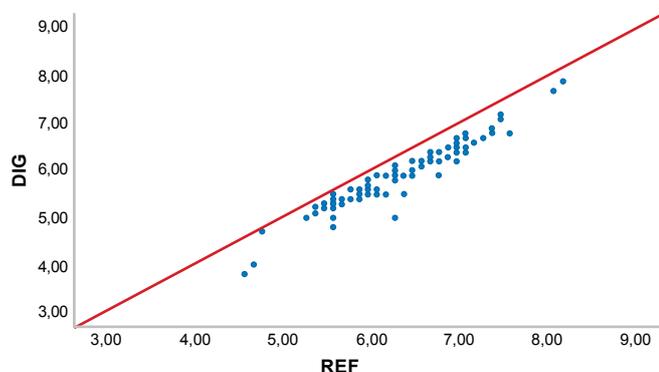
al 95 % fueron de: 0,652 y 0,837 para KIT-DIG; 0,650 y 0,836 para KIT-REF y 0,940 y 0,974 para REF-DIG. En las figuras 1, 2 y 3 se ilustran mediante gráficos de dispersión, las correlaciones entre los distintos métodos.

En la clínica hay tradición de usar el coeficiente de correlación lineal para evaluar la concordancia entre variables continuas, sin embargo no es recomendable, ya que sólo mide el grado de asociación lineal, pero no el grado de acuerdo o concordancia<sup>9,10</sup>. Así, si el grado de acuerdo entre los métodos fuera total, los puntos deberían copiar las líneas que se grafican en color rojo (llamadas líneas de igualdad entre X e Y, que van a 45 grados y pasan por el punto 0,0) en las Figuras 1 a 3.

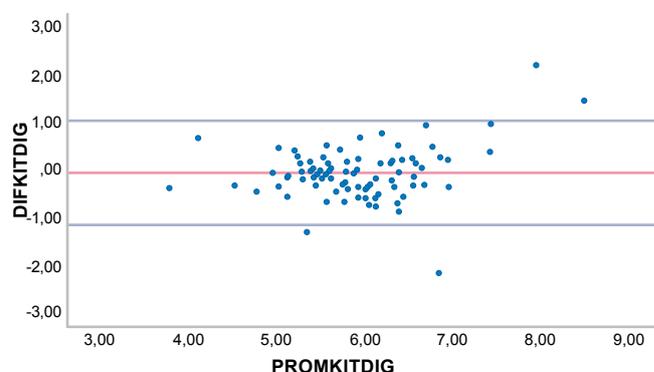
Para evitar este problema, se ha planteado la validación mediante el criterio de concordancia usando el coeficiente de correlación intraclass (CCI) para variables cuantitativas. La concordancia hace referencia al grado en que dos o más observadores, métodos, técnicas u observaciones están de acuerdo sobre el mismo fenómeno observado<sup>11</sup>. Los resultados del CCI se detallan en la Tabla 3. Los valores de CCI pueden teóricamente variar entre 0 (no hay concordancia) y 1 (concordancia total, lo que significa que todas las muestras analizadas por dos métodos distintos dan exactamente los mismos valores). En nuestro caso puede observarse que, según la clasificación propuesta por Fleiss<sup>5</sup>, la concordancia entre métodos varía entre buena y excelente.

Bland y Altman<sup>6</sup> propusieron un método gráfico sencillo para evaluar la concordancia entre dos variables

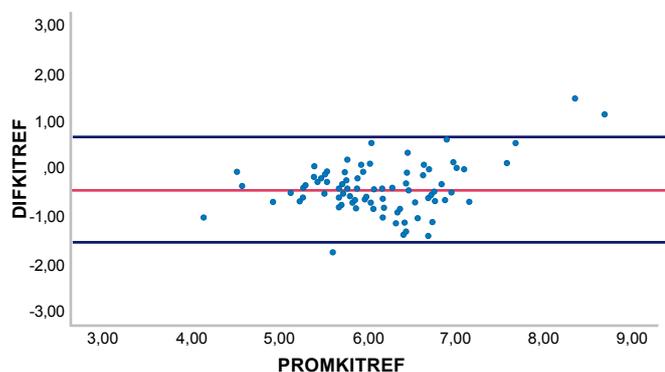
cuantitativas, y cuya aplicación ha ido aumentando en los últimos años. A continuación (Figuras 4, 5 y 6) se representan los gráficos de Bland-Altman<sup>6</sup> para nuestra población de estudio. En ellos, se pueden observar las diferencias individuales (eje Y; DIF) entre los métodos versus las respectivas medias individuales (eje X; PROM). Suele referirse como *bias* o sesgo de un método respecto al otro a la media de las diferencias<sup>10</sup>. En nuestro caso, las diferencias promedio (sesgos) entre las muestras analizadas por los diferentes métodos fueron: -0,08 g/dl entre KIT y DIG, -0,52 g/dl entre KIT y REF y 0,44 g/dl entre REF y DIG. Como se aprecia, la menor diferencia promedio estuvo entre KIT y DIG. Si se analizara una nueva muestra de un animal proveniente de una población con características similares a la del presente estudio, se esperaría (con una probabilidad del 95%) que la diferencia en los niveles de proteína cuantificada por dos de los métodos debiera estar entre los límites del acuerdo. En nuestro caso, es esperable que nuevas muestras sometidas a análisis, en el 95 % de los casos, tengan en promedio las siguientes diferencias entre uno y otro método: entre 1,02 y -1,17 g/dl para KIT y DIG, entre 0,58 y -1,63 g/dl para KIT y REF y entre 0,84 y 0,05 g/dl para REF y DIG. Es decir, que el resultado con KIT de esa nueva muestra podría ser entre 1,17 g/dl menos y 1,02 g/dl más que el resultado que se obtuviera con DIG; o, entre 1,63 g/dl menos y 0,58 g/dl más que el resultado a obtener si se procesara con REF; y una nueva muestra analizada con REF, podría ser entre 0,05



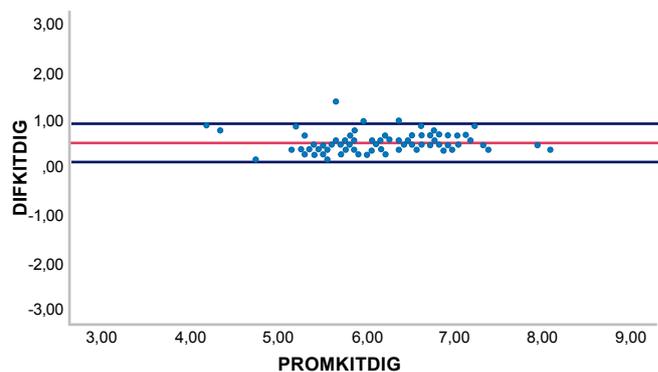
**Figura 3:** Gráfico de dispersión entre los métodos REF y DIG de cuantificación de la concentración de proteína en sueros de cabritos (n=85). REF (refractometría manual); DIG (refractometría digital)



**Figura 4:** Gráfico de Bland-Altman entre los métodos KIT y DIG de cuantificación de la concentración de proteína en sueros de cabritos (n=85). KIT (espectrofotometría); DIG (refractometría digital); PROMKITDIG (promedio entre KIT y DIG); DIFKITDIG (diferencia entre KIT y DIG)



**Figura 5:** Gráfico de Bland-Altman entre los métodos KIT y REF de cuantificación de la concentración de proteína en sueros de cabritos (n=85). KIT (espectrofotometría); REF (refractometría manual); PROMKITREF (promedio entre KIT y REF). DIFKITREF (diferencia entre KIT y REF)



**Figura 6:** Gráfico de Bland-Altman entre los métodos REF y DIG de cuantificación de la concentración de proteína en sueros de cabritos (n=85). REF (refractometría manual); DIG (refractometría digital); PROMREFDIG (promedio entre REF y DIG). DIFREFDIG (diferencia entre REF y DIG)

y 0,84 g/dl superior al resultado con DIG. En síntesis, a pesar de que la Figura 4 (KIT-DIG) tenga límites de concordancia más amplios que la Figura 6 (REF-DIG), su diferencia promedio en los valores de proteína sérica prácticamente no existe (está en torno a 0).

Por último, al analizar los datos mediante modelos lineales generales mixtos, se detectó efecto significativo ( $p < 0,001$ ) del método sobre la cuantificación de proteína en suero de cabritos. La prueba de comparaciones múltiples permitió determinar que no existen diferencias entre los resultados obtenidos con KIT ( $5,86 \pm 0,09$  g/dl) y DIG ( $5,94 \pm 0,08$  g/dl) ( $p > 0,05$ ), pero sí entre REF ( $6,38 \pm 0,08$  g/dl) y los otros dos métodos ( $p < 0,05$ ).

Con respecto a trabajos realizados en otras especies, según Rodríguez<sup>4</sup>, la refractometría y la espectrofotometría correlacionan bien cuando se analizan muestras de suero humano. En el caso de muestras de suero y plasma de origen aviar sería menos consistente; por ejemplo, Lumeij<sup>12</sup> estableció que los valores de plasma y suero provenientes de palomas (*Columba livia domestica*) determinados por refractometría eran mayores respecto a los estimados por espectrofotometría, probablemente la causa sería los altos valores de glucosa plasmática en esta especie. Por lo tanto, dichos autores no recomiendan determinar proteínas totales en muestras aviares utilizando refractometría.

Finalmente, según sostiene Cardemil<sup>13</sup>, hay que considerar que la diferencia máxima entre dos métodos

es una decisión clínica y no estadística.

## CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se han evaluado tres métodos para cuantificar proteínas totales en sueros caprinos, que difieren en el costo del equipamiento, los materiales necesarios para su desarrollo, el tiempo que insumen y el grado de capacitación técnica que requieren. Es por esto que en nuestro caso, en la búsqueda de un método validable que se adapte a las condiciones de campo, encontramos que a partir de los resultados de los diferentes análisis estadísticos realizados y considerando además un criterio de decisión desde la mirada clínica, podríamos concluir que el método de cuantificación de proteína sérica por espectrofotometría (KIT), método habitualmente utilizado en la práctica de laboratorio, podría ser reemplazado a campo por un método más sencillo, más rápido, de menor costo y que utiliza un único instrumento sin materiales adicionales, como lo es la refractometría digital (DIG).

## Conflictos de interés

Todos los autores declaran que no existe conflicto de intereses, incluyendo las relaciones financieras, personales o de otro tipo con otras personas u organizaciones que pudieran influir de manera inapropiada en el trabajo.

## REFERENCIAS

1. Alberghina D, Casella S, Vazzana I, Ferrantelli V, Giametto C, Piccione G. Analysis of serum proteins in clinically healthy goats (*Capra hircus*) using agarose gel electrophoresis. *Vet Clin Pathol* 2010; 39(3):317-332.
2. Kraft W, Dürr U. Hematología; proteínas séricas. En: Editores Médicos S.A. Diagnóstico clínico de laboratorio en veterinaria. 3ª edición. Zaragoza; 2000, p 49-159.
3. Habich G. Análisis de sangre de animales sanos como fuente de información para el manejo de rodeos lecheros. *Rev Prod Anim* 1982; 2(2):130-158.
4. Rodríguez J. El uso del refractómetro en el Laboratorio Clínico Veterinario. 1ª ed. Rosario: UNR Editora. Editorial de la Universidad Nacional de Rosario; 2018, p 11-34.
5. Fleiss JL. Reliability of measurement. In: Fleiss JL. The Design and Analysis of Clinical Experiments. New York (USA): John Wiley; 1999, p 1-31.
6. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *The Lancet* 1986; 327(8476):307-310.
7. Niurkís M, Figueiredo A. Peso Corporal: su relación con la concentración sérica de proteínas, lípidos y glucosa en cabras mestizas criollas. *Gaceta de Ciencias Veterinarias* 2004; 9(2):38-43.
8. Rossanigo C. Coccidios y Criptosporidiosis. En: Suarez

- V, Olachea F, Rossanigo C, Romero J. Enfermedades parasitarias de los ovinos y otros rumiantes menores en el cono sur de América. 1ra ed. INTA; 2011, p 231-234.
9. Martínez Curbelo G, Cortés Cortes ME, Pérez Fernández AC. Metodología para el análisis de correlación y concordancia en equipos de mediciones similares. Revista Universidad y Sociedad 2016; 8(4):65-70.
  10. Özgür Doğan N. Bland-Altman analysis: A paradigm to understand correlation and agreement. Review article. Turk J of Emerg Med 2018; 18:139-141.
  11. Atkinson G, Nevill AM. Statistical methods for assessing measurement error (reliability) in variables relevant to sports medicine. Sports Med 1998; 26(4):217-238.
  12. Lumeij JT, Bruijne JJ. Blood chemistry reference values in racing pigeons (*Columba livia domestica*). Avian Pathol 1985; 14:401-408.
  13. Cardemil F. Comparison analysis and applications of the Bland-Altman method: correlation or agreement? Medwave 2017; 17(1):e6852.



Este artículo está bajo una Licencia Creative Commons.  
Atribución-No Comercial-Sin Derivadas 4.0 Internacional  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>