

VERIFICACIÓN DEL MÉTODO DE BRADFORD PARA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.

Cacciamano M; Espósito A; Alanis N; Monteresino J; Germir P; Novillo T; De la Iglesia G, Mettan A; Ostorero M; Vilches A P.
mariangeles.cacciamano@unc.edu.ar Laboratorio de Hemoderivados UNC- Av. Valparaíso s/n Ciudad Universitaria-X5000HRA- Córdoba - Argentina

Introducción:

Las buenas prácticas de fabricación y control requieren que los métodos analíticos empleados sean verificados.

El método de BRADFORD utiliza un reactivo (solución ácida de colorante Coomassie Blue G-250), el cual interacciona principalmente con los residuos de aminoácidos básicos (histidina, arginina y lisina) y en menor medida, aminoácidos aromáticos (triptófano, tirosina y fenilalanina) dando como resultado un cambio de coloración de la solución, permitiendo la cuantificación (a 595nm) de proteínas totales en una muestra. La variación de absorbancia es proporcional a la cantidad de colorante unido a proteínas y, por ende, a la concentración de proteínas en una solución.

Por interpolación en una curva de calibración a partir de soluciones de referencia, se determina la concentración de proteínas totales en la muestra problema.

El método se aplica en nuestro laboratorio para la determinación de proteínas totales en: FACTOR VIII ANTIHEMOFILICO UNC (FVIII), ANTITROMBINA III UNC PASTEURIZADA (ATIII), COMPLEJO PROTROMBINICO UNC (CP).

Objetivo: Demostrar que el método de Bradford Bradford para evaluar proteínas en FVIII, ATIII y CP es adecuado, efectivo y cumple con los requisitos regulatorios.

Desarrollo:

- Materiales:

1. Material de Referencia: Albúmina Sérica Bovina 7 g% NIST.
2. Pipetas automáticas.
3. Espectrofotómetro UV-Vis.
4. Reactivo: Bradford.

- Método:

La verificación fue realizada por 3 analistas. Cada analista preparó una curva de calibración con 6 niveles de concentración de proteínas a partir del material de referencia (MR) Albúmina Sérica Bovina NIST (7g%), de modo tal que cubra el rango entre 10 a 100 mg%. El analista 1 realizó 5 réplicas de cada concentración mientras que el analista 2 y el 3 realizaron 3 réplicas de cada una.

Se evaluó **Veracidad, Precisión** (Repetibilidad (intra-ensayo)-Precisión intermedia (inter-ensayo)), **Linealidad y Rango**.

Resultados:

- Veracidad: Porcentaje de Recuperación (R%) entre 96-98 %, (criterio de aceptación: R%: $100 \pm 15\%$).
- Precisión:
Repetibilidad (intra-ensayo): Coeficiente de Variación porcentual (CV%) < 8% (criterio de aceptación: CV%<15%).
Precisión intermedia (inter-ensayo): CV% < 9%, (criterio de aceptación: CV%<15%).
- Linealidad: Coeficiente de determinación (R^2) = 0,99, criterio de aceptación $R^2 \geq 0.98$.
- Rango: 10-100 mg%.

Conclusión:

De acuerdo a los resultados obtenidos, queda demostrado que el método para determinación de proteínas Bradford para la determinar la aptitud de la concentración de proteínas en FVIII, ATIII y CP es adecuado, efectivo y cumple con los requisitos regulatorios.