

## DETERMINACION COLORIMETRICA DE ALBUMINA SERICA BOVINA (ASB), EN LECHE UTILIZANDO VERDE DE BROMOCRESOL

AMADO GUZMAN A.<sup>1</sup>

MARCELO PEREZ D.<sup>2</sup>

RENE MARQUEZ M.<sup>3</sup>

JUAN GARZA R.<sup>4</sup>

### RESUMEN

Un método colorimétrico para detectar albúmina humana en suero sanguíneo fue adaptado para determinar ASB en leche. La técnica modificada es como sigue: 2.5 ml de reactivo diluido 1:5, (26 ml de NaOH al 10%, 30 ml de ácido láctico al 85%, 500 mg de verde de bromocresol, 10 ml de tween 20, aforado a 1 l de agua destilada y el pH ajustado a 4.0 con NaOH) se mezclan con 0.1 ml de suero de leche, se agita, se deja reposar 5 min., a temperatura ambiente y se leen en el espectrofotómetro a 630 nm de longitud de onda. El rango de concentración de ASB detectable por este método fue de 0.2 a 6.4 mg/ml y el coeficiente de correlación en este

rango fue de 0.99. Este método resulta sencillo, económico, sensible y se recomienda para estudios de la variación de los niveles de esta proteína en leche bajo diferentes condiciones de fisiopatología de la glándula mamaria.

### INTRODUCCION

El diagnóstico de la mastitis bovina está basado en técnicas citológicas y bacteriológicas principalmente (Giesecke, 1974; Giesecke y Van Den Heever, 1974; Kitchen, 1981), sin embargo, ocurren cambios en la concentración de algunos otros componentes de la leche tales como algunas proteínas, enzimas y electrolitos, cuando existe daño al tejido glandular (Schalm, Carroll y Jain, 1971; Kitchen, 1981). La composición proteica de la leche varía en caso de inflamación de la glándula mamaria y proteínas sanguíneas que normalmente no existen o se encuentran presentes en la leche en bajas concentraciones se elevan en casos de mastitis (Haenlin, Schultz y Zikakis, 1971; Randolph, Erwin y Richter, 1974; Garza, Ríos y Arriola.

1 Coord. Reg. del Golfo. Sector Pecuario del INIFAP, SARH, Apdo. Postal 1224. Veracruz, Ver. Méx. C.P. 91700.

2 Depto. de Ruminología Básica. Sector Pecuario del INIFAP, SARH. Km. 15.5 Carr. México-Toluca, México, D. F. C.P. 05110.

3 Depto. de Fisiopatología, Sector Pecuario del INIFAP, SARH, Km. 15.5 Carr. México-Toluca, México, D. F., C.P. 05110

4 Dirección Gral. de Biológicos y Reactivos. Amores 1210, Col. del Valle, México, D. F.

1974). Entre estas proteínas se encuentra la albúmina sérica bovina (ASB), cuya concentración en leche se eleva inmediatamente en inflamaciones agudas de la glándula mamaria provocadas experimentalmente (Shah y Morse, 1964; Harmon *et al.*, 1976; Giesecke y Viljoen, 1974; Giesecke y Van Den Heever, 1981; Fitzgerald, Deeth y Kitchen, 1981), así como en infecciones naturales demostradas por la presencia de gérmenes patógenos y por altas cuentas celulares en leche (Giesecke 1974; Smith *et al.*, 1979). Se ha sugerido que la medición de los niveles de esta proteína en leche podría ser útil en el diagnóstico de mastitis, tal vez en conjunción con la cuenta celular (Giesecke y Viljoen, 1974; Giesecke 1974).

Para medir las concentraciones de esta proteína en leche se han utilizado técnicas tales como inmunodifusión (Shah, Morse y Pitkin, 1963; Viljoen, 1974), precipitación por sales de sulfato de amonio y electroforesis en papel (Shah, Morse y Pitkin, 1963) electroforesis en papel (Schalm, Carrrol y Lasmanis, 1963), electroforesis en gel de almidón (Garza, Ríos y Arriola, 1974) electroforesis en gel de poliacrilamida (Haenlin, Schultz y Zikakis, 1972; Randolph, Erwin y Richter, 1974) y electroforesis de Laurell (Smith, *et al.*, 1979), sin embargo la mayoría de estas técnicas son laboriosas y tardadas que requieren de mediciones densitométricas.

La ASB posee capacidad de unirse a diversos colorantes como el naranja de acridina, ácido 2-(4-hidroxiazobenceno)-benzoico (HABA) y el verde de bromocresol (Tietz, 1976) y con base en esta última característica se han desarrollado métodos para determinar albúmina en suero sanguíneo de humano, (Rodkey, 1965; Doumas, Watson y Biggs, 1971; Miyada *et al.*, 1972). La ASB posee una constante

de asociación con el verde de bromocresol menor que la de la albúmina humana, lo que causa una reacción colorimétrica de menor intensidad (Rodkey, 1965). Por otra parte, la concentración de albúmina en suero sanguíneo humano es mayor de 3.25 g/100 ml (Wintrobe *et al.*, 1975) mientras que la concentración en leche normal puede ser tan baja como 0.2 mg/ml (0.02 g/100 ml) (Kitchen, 1981), lo que impone otra dificultad probable en la utilización de esta técnica para medir ASB en leche. Gutiérrez (1978) intentó determinar cantidades de esta proteína en leche utilizando verde de bromocresol sin que lograra determinar concentraciones específicas de ASB pero, si observó un incremento en la absorbancia cuando se usaron leches procedentes de vacas con mastitis experimental. El presente trabajo tiene como objetivo el adaptar y evaluar un método colorimétrico para determinar concentraciones de ASB en leche utilizando verde de bromocresol.

## MATERIAL Y METODOS

Se utilizó el "reactivo de color para albúmina" producido por la Dirección General de Biológicos y Reactivos de la Secretaría de Salud del Gobierno Mexicano, el cual es utilizado para realizar determinaciones de albúmina sérica humana en suero sanguíneo. La composición de este producto consiste en NaOH al 10% (26 ml), ácido láctico al 85% (30 ml), verde de bromocresol (500 mg), tween 20 (10 ml) todo en agua destilada (a 1 litro) y el pH ajustado a 4.0 con NaOH a temperatura ambiente. El experimento se dividió en 3 partes:

Parte I. Establecimiento de la relación reactivo:muestra y el rango de concentración detectable. El objetivo de esta parte fue establecer el

rango de concentración de ASB detectable por este método, así como determinar la cantidad de reactivo y de muestra a utilizar para realizar determinaciones dentro de este rango de concentración. Se prepararon concentraciones dobles de ASB (Fracción V, Sigma Chemical Co. St. Louis Miss. USA), en agua destilada desde 0.2 hasta 25.6 mg/ml de las cuales se utilizaron diferentes cantidades de muestra y de reactivo de acuerdo al Cuadro 1, por lo que se probaron las siguientes relaciones de reactivo:muestra: 5:0.025, 5:0.05, 5:0.1, 2.5:0.1 y 1.25:0.1 (ml) (Tratamiento A, B, C, D y E respectivamente). La mezcla de muestra y reactivo se dejó reposar por 5 minutos y posteriormente se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 630 nm. Las absorbancias obtenidas para cada concentración, en cada relación de reactivo:muestra, se graficaron en un plano de coordenadas cartesianas, y en el rango donde los puntos se mantuvieron lineales, se calcularon los coeficientes de correlación entre absorbancia y concentración (Snedecor y Cochran, 1981).

Parte II. Establecimiento del método de preparación de la leche. Obser-

vaciones personales preliminares al trabajo, así como observaciones realizadas por Gutiérrez (1978) indicaron que al tratar de determinar ASB en leche utilizando el reactivo de verde de bromocresol se formaban precipitados de caseína que impedían realizar las lecturas, por lo que se procedió a definir en qué forma debía ser procesada la leche para realizar las determinaciones. La leche se sometió a 4 tratamientos A) leche entera; B) leche semidescremada, (por centrifugación a 3500 rpm por 20 min); C) suero de leche entera y D) suero de leche semidescremada. El suero se obtuvo con renina 1:10 000 a razón de una gota por 10 ml de leche, incubando por 15 min a 37°C en baño María y centrifugando a 3000 rpm por 20 min. A estas leches se les agregó ASB a las siguientes concentraciones 0.25 y 0.5 g/100 ml utilizando 0.1 ml como muestra y 2.5 ml de reactivo (1:5) efectuando 3 repeticiones para cada tratamiento. Se calcularon diferencias en las absorbancias producidas en los diferentes tratamientos por medio de un análisis de varianza (Snedecor y Cochran, 1981).

Parte III. Establecimiento final de

CUADRO 1.

CONCENTRACIONES DE ALBUMINA SERICA BOVINA (ASB) Y RELACIONES REACTIVO:MUESTRA ESTUDIADAS EN LA PARTE I.

Concentración de ASB en las muestras (mg/ml) (1)	Cantidad de muestra ml	Cantidad de reactivo ml (2)	Tratamiento
0.2 a 25.6 <sup>(3)</sup>	0.025	5	A
0.2 a 25.6	0.05	5	B
0.2 a 25.6	0.1	5	C
0.2 a 25.6	0.1	2.5	D
0.2 a 25.6	0.1	1.25	E

1) 3 repeticiones para cada concentración.

2) el reactivo se diluyó 1:5 en agua destilada.

3) se hicieron concentraciones dobles desde 0.02 g/100 ml hasta 2.56 g/100 ml.

CUADRO 2.

TRATAMIENTOS Y CONCENTRACIONES DE ALBUMINA SERICA BOVINA (ASB) UTILIZADOS DURANTE LA PARTE III.

Tratamiento	Cantidad reactivo <sup>(3)</sup>	(ml) de muestra	Concentración de ASB en las muestras <sup>(1)</sup>
B	5	0.05	0.2 a 6.4 <sup>(2)</sup>
C	5	0.1	0.2 a 6.4
D	2.5	0.1	0.2 a 6.4
E	1.25	0.1	0.2 a 6.4

1) 5 repeticiones para cada concentración

2) se hicieron concentraciones dobles desde 0.2 hasta 6.4 mg/ml

3) el reactivo se diluyó previamente 1:5.

la relación reactivo:muestra y evaluación del método. Utilizando el tipo de muestra con mejor comportamiento en la parte II (suero de leche sin descremar) se prepararon concentraciones dobles de 0.2 a 6.4 mg/ml y se procesaron por cuatro tratamientos (relaciones reactivo:muestra) B) 5:0.05 C) 5:0.1, D) 2.5:0.1 y E) 1.25:0.1 ml de reactivo y muestra respectivamente con 5 repeticiones como se indica en el Cuadro 2. Se calcularon los coeficientes de correlación entre concentración y absorbancia así como la

diferencia entre la concentración real de ASB presente en el suero y la concentración determinada en las lecturas de cada tratamiento expresada en porcentaje, tomando como 100% la concentración real de la muestra (diferencia porcentual). Se utilizó un análisis de varianza para un diseño en bloques (concentraciones) al azar, las diferencias entre tratamientos se determinaron por la prueba de Tukey (Gill, 1978). El valor de la diferencia porcentual se transformó al  $\arcsen \sqrt{x}$  para fines del análisis estadístico.

CUADRO 3.

COEFICIENTES DE CORRELACION Y DE DETERMINACION DE CADA UNA DE LAS 5 DILUCIONES PROBADAS EN LA PARTE I PARA EL RANGO DE CONCENTRACION DE 0.2 a 6.4 mg DE ALBUMINA SERICA BOVINA (ASB)/ml.

Tratamiento	Cantidad (ml)		r	r <sup>2</sup>	F.c	Rango de Absorbancia
	Reactivo	Muestra				
A*	5	0.025	-	-	---	---
B	5	0.05	0.9935	0.987	1150	0.004 a 0.163
C	5	0.1	0.9976	0.9953	2974	0.010 a 0.386
D	2.5	0.1	0.9995	0.9989	13735	0.20 a 0.723
E	1.25	0.1	0.9983	0.9967	5373	0.37 a 1.235

\* No sensible para detectar concentraciones de 0.2 mg/ml.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Parte I. Las gráficas de las concentraciones de ASB utilizadas y las absorbancias producidas se encuentran en la Figura 1. Se observó que con excepción del tratamiento A. en todos los demás, los puntos se mantuvieron lineales en el rango de 0.2 a 6.4 mg/ml. Los coeficientes de correlación, de determinación así como las Fc para los ANDEVA de las ecuaciones de regresión calculadas en este rango de concentraciones de ASB (Draper y Smith, 1981) se muestran en el Cuadro 3. Al utilizar una relación de reactivo:muestra de 2.5 ml:0.1 ml (tratamiento D) se observó el mayor coeficiente de correlación ( $r > 0.99$ ), y es por lo tanto el mejor tratamiento, el rango de sensibilidad al utilizar esta relación abarca la concentración mínima reportada en leche que es de 0.2 mg/ml (Kitchen, 1981) y brinda un margen amplio de concentración de ASB para realizar las lecturas.

Parte II. Al probar leche entera o semidescremada se pudo observar que se formaron precipitados de ca-

seína que arrastraron consigo al colorante e impedían realizar las lecturas espectrofotométricas, lo que concuerda con lo informado por Gutiérrez (1978). Al utilizar el suero de leche, semidescremada o no, no se observaron diferencias significativas en las absorbancias obtenidas con las diferentes concentraciones de ASB (Cuadro 4) por lo que se concluye, que utilizar suero de leche entera es adecuado. La utilización del suero de leche para poder determinar ASB en la misma, es recomendada en diversas técnicas como electroforesis en papel (Carroll, Schalm y Lasmanis, 1963; Shah y Morse, 1964) y electroforesis en gel de poliacrilamida (Randolph, Erwin y Richter, 1974), mientras que en otras no se requiere utilizar el suero de la leche, como la electroforesis de Laurell (Smith et al., 1979) y la inmunodifusión radial (Viljoen, 1974) sin embargo, todas estas técnicas son más complejas y tardadas (16-48 h).

Parte III. Las correlaciones entre concentración de ASB y absorbancia, así como las medias de las desviaciones porcentuales de las lecturas obtenidas

CUADRO 4.

ABSORBANCIAS OBTENIDAS EN LOS DIFERENTES TIPOS DE MUESTRAS PARA DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ALBUMINA SERICA BOVINA (ASB) EN LA PARTE II.

Tipo de muestra	Concentración de ASB en la muestra		
	0	0.25	0.5
* Leche entera (L.E.)	-	---	---
* Leche descremada (L.D.)	-	---	---
Suero de L.E.	.143	.272	.67
Suero de L.D.	.142	.275	.71

\* No fue posible la lectura.

### CUADRO 5.

#### MEDIAS DE LAS DESVIACIONES PORCENTUALES DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS UTILIZADOS EN LA PARTE III.

Tratamiento	X de la desviación porcentual	r
B	1.6627 (a) (6.4615) (1)	0.9976
C	1.5624 (a) (5.1998)	0.9934
D	1.2557 (b) (2.6003)	0.9993
E	1.4449 (a) (4.0113)	0.9970

a, b literales diferentes indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

1) valores entre parentesis, son transformación al valor absoluto de la media presentada como arcsen

nidas en cada tratamiento se muestran en el Cuadro 5. Al utilizar 2.5 ml de reactivo (1:5) y 0.1 ml de suero de leche (tratamiento D) se obtiene una  $r > 0.99$  así como la menor diferencia porcentual en las concentraciones determinadas con respecto a las reales, ( $P < 0.05$ ), esta diferencia fue de aproximadamente 2.6% en el rango de concentración de 0.2 a 6.4 mg/ml en el cual se produce una absorbancia de 0.02 a 0.723 (Cuadro 3). Por otra parte se observó que los sueros

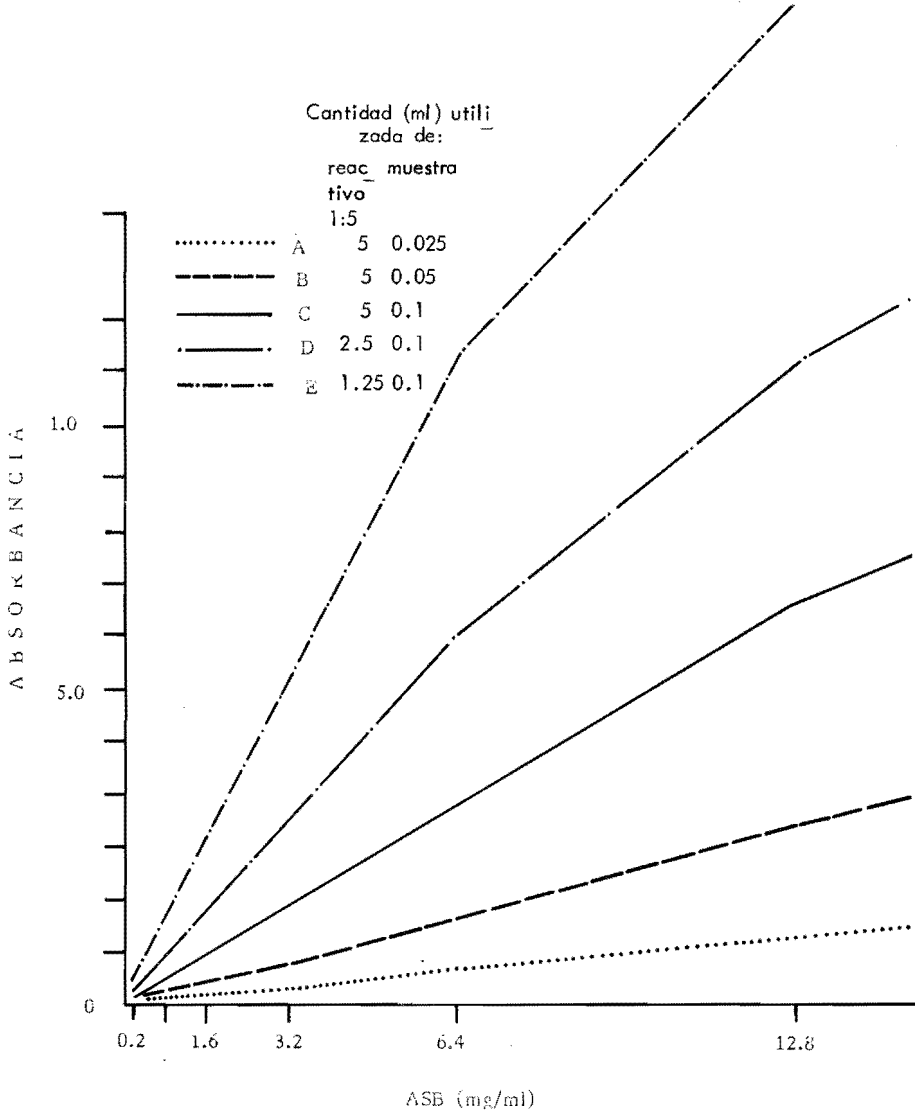
pueden ser almacenados por varias semanas en congelación sin que se altere la concentración de ASB.

#### CONCLUSIONES

Este método colorimétrico para determinar ASB en leche presenta ventajas de economía, simplicidad y rapidez sobre la mayoría de los métodos de determinación de ASB en leche anteriormente empleados. Por estas mismas razones puede ser utilizado para

FIG. 1.

ABSORBANCIA PRODUCIDA POR DIFERENTES CONCENTRACIONES DE albúmina sérica bovina (ABS) EN LAS DIFERENTES RELACIONES REACTIVO MUESTRA UTILIZADAS EN LA PARTE I.



estudios de las variaciones de esta proteína en la leche bajo diferentes condiciones de fisiopatología de la glándula mamaria tendientes a deter-

minar su importancia como un índice del estado de salud de la misma, o bien en estudios fisiológico-metabólicos.

## SUMMARY

A colorimetric method using bromocresol green used for the determination of human serum albumin was adapted for the determination of bovine serum albumin (BSA) in milk. The method is as follows: 2.5 ml of 1:5 dilution of reagent (26 ml of NaOH at 10%, 30 ml of lactic acid at 85%, 500 mg of bromocresol green, 10 ml of tween 20, complete to 1 l with distilled water, adjust pH to 4.0 with NaOH) is mixed with 0.1 ml of whey, shake well and left stand for 5 minutes at room temperature, after which the mixture is read in the spectrophotometer at 630 nm. The detectable concentration range using this method, is 0.2 to 6.4 mg/ml and the correlation coefficient in this range was higher than  $r=0.99$ . This method is very simple, economic and sensible and can be recommended for studies on BSA levels in milk under different physiologic and pathologic conditions of the mammary gland.

## LITERATURA CITADA

- CARROLL, E.J., SCHALM, O.W. and LASMANIS, J., 1963. Experimental coliform (*Aerobacter aerogenes*) mastitis: Distribution of whey proteins during the early acute phase. *J. Dairy Sci.* 46:1236.
- DOUMAS, B.T., WATSON, W.A. and BIGGS, H.G., 1971. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin. Chem.* 31:87.
- DRAPER, N.R. and SMITH, H. 1981. Applied regression analysis. *John Willey and sons.* New York. U.S.A.
- FITZGERALD, C.H., DEETH, H.C., and KITCHEN, B.J. 1981. The relationship between the levels of free fatty acids, lipoprotein lipase, carboxylesterase, N-acetyl-D-glucosaminidase, somatic cell count and other mastitis indices in bovine milk. *J. Dairy Res.* 48:253.
- GARZA, R.J., RIOS, M.E. y ARRIOLA, J., 1974. Proteínas plasmáticas sanguíneas en leche de vacas con mastitis. *Not. Med. Vet.* 4:253.
- GIESECKE, W.H., 1974. The diagnosis of subclinical mastitis in lactating cows. *J.S. Afr. Vet. Med. Ass.* 45:195.
- GIESECKE, W.H. and VAN DEN HEEVER, L.W., 1974. The diagnosis of bovine mastitis with particular reference to subclinical mastitis. A critical review of relevant literature. Onderstepoort *J. Vet. Res.* 41(4):169.
- GIESECKE, W.H. and VAN DEN HEEVER, L.W., 1981. Levels of glucose, serum albumin and somatic cells before and during early stages of acute clinical mastitis artificially induced in cows by means of humans strains of group-B Streptococci (GBS) Administered intracisternally. Onderstepoort. *J. Vet. Res.* 48:69.
- GIESECKE, W.H. and VILJOEN, M.H., 1974. The diagnosis of subclinical mastitis in lactating cows: a comparison of cytological methods and a monovalent radial immunodiffusion test. Onderstepoort. *J. Vet. Res.* 41(2):51.
- GILL, G.J., 1978. Design and analysis of experiments in the animals and medical sciences. V.I. *The Iowa State University Press.* Ames Iowa, U.S.A.
- GUTIERREZ, M.H., 1978. Cuantificación de albúmina sérica en leche por método colorimétrico y su empleo en el diagnóstico de la mastitis subclínica bovina. Tesis Prof. *Fac. Med. Vet. Zoot. U.N.A.M.*
- HAENLIN, G.F., SCHULTZ, L.H. and ZIKAKIS, J.P., 1972. Composition of proteins in milk with varying leucocyte contents. *J. Dairy Sci.* 56 (3):1017.
- HARMON, R.J., SCHANBACHER, T.L., FERGUSON, L.C. and SMITH, L. 1976. Changes in lactoferrin, immunoglobulin G., bovine serum albumin, and lactalbumin during acute experimental and natural coliform mastitis in cows. *Infect. Immun.* 13(2):533.
- KITCHEN, B.J., 1981. Review of the progress of dairy science: bovine mastitis milk compositional changes and related diagnostic test. *J. Dairy Res.* 48:167.
- MIYADA, S.D., BAYSINGER, Y., NOTRICA, S., and NAKAMURA, R.M. 1972. Albumin quantitation by dye binding and salt fractionation techniques. *Clin. Chem.* 18 (1):52.



RANDOLPH, H.E., ERWIN, R.E and RICHTER, L.R. 1974. Influence of mastitis on properties of milk. VII. Distribution of milk proteins. *J. Dairy Sci.* 57(1):15.

RODKEY, F.L., 1965. Direct spectrophotometric determination of albumin in human serum. *Clin. Chem.* 11(4):478.

SCHALM, O., CARROLL, E., and JAIN, N. 1971. Bovine mastitis. *Lea and Febiger*. Philadelphia. P.A.

SHAH, P.C. and MORSE, G.E., 1964. Studies on albumin in mastitic milk: Factors affectin the presence of blood-serum albumin in "mastitic" milk. *Am. J. Vet. Res.* 25(106):714.

SHAH, P.C., MORSE, G.E., and PITKINS, D.H., 1963. An albumin-like protein in "mastitic" milk I. Physical, Chemical and Immunologic identification. *Am. J. Vet. Res.* 24(101):723.

SMITH, A.M., CHESWORTH, J.M., HENDERSON, G.D., and RODWAY, R.G. 1979. Use of Laurell electrophoresis for the quantitative measurement of albumina in mastitic milk. *J. Dairy Res.* 46:547.

SNEDECOR, G., y COCHRAN, W., 1981. *Metodos estadísticos CECSA*. México.

TIETZ, N., 1976. *Fundamentals of clinical chemistry*, Sec. Ed. *Norbert. W. Tietz*. Chicago, Ill., U.S.A.

VILJOEN, M.H., 1974. The isolation and identification of an antigen for the diagnosis of bovine mastitis by radial immunodiffusion. Ondersterpoort. *J.Vet. Res.* 41(3):93

WINTROBE, M.H., LEE, G.R., BOOGS, D.R., BITHELL, T.C., THEUS, J.O.A. and FOERSTER, J., 1975. *Clinical hematology*. *Lea & Febiger*. Philadelphia P.A., U.S.A.