

FINALIDADE

Sistema colorimétrico para determinação de proteínas na urina e líquor.

Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO

Vermelho de pirogalol, em meio ácido, com a presença de molibdato de sódio reage com proteínas formando um cromóforo quantificado por espectrofotometria em 600nm. Este corante forma complexos corados com albumina e globulinas presentes na urina ou líquor.

METODOLOGIA

Vermelho de Pirogalol

REAGENTES

Reagente de cor: Contém vermelho de pirogalol 60µmol/L, molibdato de sódio 40µmol/L, succinato de sódio 50mmol/L, pH2,3.

Solução Padrão: Solução, aquosa, protéica 100mg/dL.

APRESENTAÇÃO

MICROPROTE Ref. 50

Reagente de Cor 1 x 50mL
Solução Padrão 1 x 5mL

MICROPROTE Ref. 200

Reagente de Cor 2 x 100mL
Solução Padrão 1 x 5mL

NÚMERO DE TESTES

Ref. 50

Manual - 50 testes (20µL amostra / 1mL Reagente de cor)
Automação (*) 166 testes

Ref. 200

Manual - 200 testes (20µL amostra / 1mL Reagente de cor)
Automação (*) 666 testes

(*) A quantidade de testes na automação é variável de acordo com o equipamento.

Protocolos de automação encontram-se disponíveis no site Doles ou através do Serviço de Atendimento ao Consumidor.

EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS

- Banho Maria 37°C.
- Cronômetro.
- Espectrofotômetro ou fotocolorímetro capaz de medir a absorvância em 600nm.
- Pipetas semiautomáticas 20µL.
- Pipetas graduadas.
- Ponteiras descartáveis.
- Tubos de ensaio.

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Reagente de cor: armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, se obedecidas as condições de armazenamento.

Solução padrão 100mg/dL: armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, se obedecidas as condições de armazenamento. Deve-se tomar cuidado no manuseio do padrão, a fim de se evitar contaminação bacteriana.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES COM O USO DOS REAGENTES

Todos os reagentes são somente para uso diagnóstico *in vitro*. Seu manuseio deve ser cuidadoso, evitando-se o contato com pele e mucosas. Em caso de contaminação acidental, lavar a área afetada em água corrente. O descarte do material utilizado deverá ser feito obedecendo-se aos critérios de biossegurança estabelecidos pelo laboratório, de acordo com as normas locais, estaduais ou federais.

Observar ainda a simbologia constante nos rótulos do produto:



Irritante

AMOSTRA

Urina ou líquor. **As amostras deverão ser centrifugadas antes do ensaio.** O USO DE AMOSTRAS NÃO CENTRIFUGADAS PODERÁ LEVAR A RESULTADOS FALSAMENTE ELEVADOS. A hemólise invalida o teste, pois a concentração proteica no sangue total é superior à encontrada no LCR e urina. O uso de conservantes para urina tais como, ácido clorídrico, ácido benzóico ou timol podem causar resultados falsamente diminuídos. A amostra permanece estável por 5 dias, se conservada bem fechada e mantida sob refrigeração (2-8°C).

Todas as amostras biológicas devem ser consideradas como potencialmente infectantes.

PROCEDIMENTO TÉCNICO

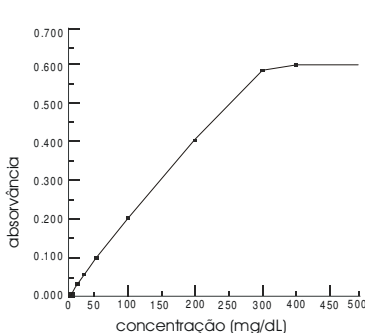
Rotular 3 tubos de ensaio com B (branco), T (teste) e P (padrão).

Proceder como segue:

	B	T	P
Água	20µL	-	-
Padrão	-	-	20µL
Amostra	-	20µL	-
Reagente de Cor	1mL	1mL	1mL

Homogeneizar e incubar a 37°C por 10 minutos. Selecionar o comprimento de onda de 600nm (580-620nm). Zerar o aparelho com o tubo B (branco). Ler as absorvâncias dos tubos P (padrão) e T (teste). A cor desenvolvida permanece estável por 30 minutos.

CURVA DE CALIBRAÇÃO



Padrão	Absorvância	Conc. (mg/dL)
0	0.000	0,000
12,5	0.025	12,5
25	0.048	24,0
50	0.101	51,0
100	0.200	100,0
200	0.395	197,5
300	0.575	287,5
400	0.605	302,5
500	0.606	303

Obs.: Não utilizar esta curva para determinar o resultado de seu ensaio.

- A curva de calibração é a representação gráfica da relação entre os valores das absorvâncias com os valores das concentrações de um conjunto de soluções padrão. São necessários três passos para confeccioná-la: (1) preparo das soluções padrão; (2) medição dos valores de absorvância das soluções padrão, de acordo com o especificado no procedimento técnico da presente instrução de uso, e (3) montagem de um gráfico, em papel especial,



linear, onde são relacionados os valores de absorvância com os de concentração, conforme demonstrado na figura acima.

As dosagens para montagem da curva foram feitas em um espectrofotômetro "Ultrspec III", Pharmacia Biotec, comprimento de onda de 600nm e cubetas com passagem de luz de 10mm.

- A curva de calibração demonstra a linearidade da reação até uma determinada concentração, na qual pode ser determinado um fator de calibração (F), de acordo com a Lei de Beer.
- A reação é linear até 300mg/dL (ver curva acima). Obtendo-se valores mais elevados, dilui-se (1:2 ou 1:4) a amostra com água deionizada e procede-se à nova dosagem. A diluição deve apresentar um valor situado entre 10 e 100mg/dL. Multiplicar o valor encontrado pelo fator de diluição.
- O kit de Microprote Doles possui padrão no intervalo de linearidade da metodologia adotada. O laboratório deve realizar o ensaio com o padrão que acompanha o kit e calcular seu fator de calibração (F), de acordo com o exemplo estabelecido nos cálculos.
- O fator deverá ser feito periodicamente e a cada lote do produto.

CÁLCULOS

Para avaliação do resultado é imprescindível verificar se o resultado obtido encontra-se dentro do limite de detecção do kit (7 a 300mg/dL). Para valores abaixo da sensibilidade pode-se repetir o ensaio dobrando-se o volume de amostra e mantendo o volume de reagente de cor. O resultado encontrado deverá ser dividido por 2. Obtendo-se valores > 300mg/dL, dilui-se (1:2 ou 1:4) a amostra com água deionizada e procede-se à nova dosagem. Multiplicar o valor encontrado pelo fator de diluição. A diluição deve apresentar um valor situado entre 10 e 100mg/dL.

• Determinação do Fator (F)

Como a reação corada segue estritamente a lei de Beer, basta que se determine um fator (F) para cálculo dos resultados. Para a obtenção do fator, recomenda-se dosar em triplicata o padrão, ler as absorvâncias e calcular a média aritmética.

$$\text{Fator (F)} = \frac{100}{\text{Abs.Padrão}}$$

• Determinação da Amostra (mg/dL)

$$\text{Proteína (mg/dL)} = \text{Absorvância teste} \times F$$

Exemplo:

Leituras:

Padrão (P) = 0,203, 0,201, 0,202

Teste (T) = 0,020

$$\text{Média aritmética: } \frac{0,203 + 0,201 + 0,202}{3} = 0,202$$

$$\text{Fator (F)} = \frac{100}{0,202} = 495,05$$

$$\text{Proteína (mg/dL)} = 0,020 \times 495,05 = 9,9$$

• Determinação Proteína/Urina de 24 horas

$$\text{Proteína urina de 24hs} = \text{Proteína (mg/dL)} \times \frac{\text{Vol. Urinário 24hs}}{100}$$

Exemplo

Leituras:

Proteína urina (mg/dL) = 9,9mg/dL

Volume urinário (mL) = 1000mL

$$\text{Proteína urina de 24hs} = \frac{9,9 \times 1000}{100} = 99\text{mg/24hs}$$

EXPRESSÃO DOS RESULTADOS EM UNIDADES S.I.

$$\text{Proteínas (g/L)} = \frac{(\text{proteína mg/dL})}{1000} \times 10$$

Exemplo

Proteína = 20mg/dL

$$\text{Proteína (g/dL)} = \frac{(20 \times 10)}{1000} = 0,2\text{g/L}$$

LIMITAÇÕES DO SISTEMA

- Para se obter ótimo desempenho do sistema, é necessário que o procedimento técnico seja rigorosamente seguido conforme instruções de uso. Qualquer alteração poderá levar a resultados errôneos.
- Falsos resultados elevados na urina ocorrem em presença de drogas como cefalotina, clorpromazina, penicilina em altas dosagens, sulfametoxazol e vários contrastes radiológicos.
- Sangue na amostra de LCR invalida o teste, pois a concentração proteica no sangue total é bem superior à encontrada no LCR.

CONTROLE DA QUALIDADE DO SISTEMA

1. A limpeza e a secagem adequada do material a ser utilizado são de fundamental importância para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
2. A água utilizada na limpeza do material, no preparo dos reagentes e na dosagem deve ser de boa qualidade.
3. Colunas deionizadoras saturadas liberam íons diversos, amins e agentes oxidantes, que deterioram os reagentes.
4. As pipetagens devem ser precisas.
5. Resquícios de detergentes podem introduzir alterações significativas.

VALORES DE REFERÊNCIA

É recomendado que cada laboratório estabeleça sua própria faixa de valores de referência na população atendida.

Como orientação sugerimos os seguintes valores:

Urina: < 150mg/24 horas.

Líquor: 10 a 45mg/dL.

SIGNIFICADO CLÍNICO

Em condições normais, a excreção urinária de proteína é inferior a 150mg/24 horas, sendo constituída por albumina (+- 40%) 10% por proteínas de peso molecular inferior ao da albumina e o restante por uma glicoproteína de baixo peso molecular de nome Tamm-Horsfall. Esta proteína é secretada ao nível dos túbulos distais. Cilindros hialinos formados no túbulo distal são constituídos por esta proteína. A proteinúria pode ter origem glomerular ou tubular.

A proteinúria glomerular acontece por aumento da permeabilidade do capilar glomerular. O processo se inicia com a perda de proteínas de baixo peso molecular, sendo a mais expressiva a albumina. Sendo as lesões de caráter evolutivo há perda de globulinas e outras proteínas de alto peso molecular. A perda de proteína pela urina pode atingir 3g/dia. É encontrada em patogenias específicas do parênquima renal, tendo como exemplo glomerulonefrites crônicas evolutivas.

A proteinúria glomerular benigna ou funcional (perda inferior a 800mg/dia) em geral é devida ao aumento do fluxo sanguíneo glomerular e são, transitórias. É encontrada após exercício, quadro febril, insuficiência cardíaca congestiva, exposição ao frio intenso, arterioesclerose, hipertensão.

A proteinúria tubular deve-se à incapacidade dos túbulos renais de realizarem a absorção total. É provocada por uma disfunção, ou ainda, quando o excesso de proteínas no líquido tubular ultrapassa a capacidade reabsortiva dos mesmos. É secundária a lesões dos túbulos por drogas nefrotóxicas ou situações de grandes estresses como queimaduras extensas, pancreatite aguda, etc.

Nas patologias crônicas, é comum a coalescência dos dois padrões de proteinúria.

Elevações de proteínas no LCR são encontradas nas meningites bacterianas, virais e fúngicas, punção traumática, esclerose múltipla, hérnia de disco e infarto cerebral. No hipertiroidismo, a proteína encontra-se diminuída no LCR.



CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Foram realizados ensaios em 29 amostras em paralelo com uma metodologia de referência. A comparação do método do kit de Microprote Doles (Y) com o Kit de metodologia similar, deu origem à seguinte equação de regressão linear: $0,970X - 1,767$, sendo o coeficiente de correlação 0,98.

Repetitividade:

Foram realizadas 20 dosagens sucessivas, com 3 amostras, obtendo-se os seguintes resultados:

Parâmetros	Amostra 1	Amostra 2
Média	26,47	63,67
Desvio padrão	0,70	1,66
Coeficiente de variação (%)	2,6	2,6

Reprodutibilidade:

foram realizadas 20 ensaios em dias alternados de três amostras distintas.

Parâmetros	Amostra 1	Amostra 2
Média	25,48	64,59
Desvio padrão	0,96	1,59
Coeficiente de variação (%)	3,8	2,5

As variações obtidas encontram-se diretamente relacionadas com as condições técnicas utilizadas para a realização do ensaio.

Especificidade: a presente metodologia é específica para determinação de proteínas na urina e líquido.

Sensibilidade: 7mg/dL. A sensibilidade do sistema está estritamente relacionada com a sensibilidade do método e do aparelho utilizado na leitura.

Diluição da matriz: estudos sucessivos de diluição da matriz mostraram que não há interferência na sensibilidade diagnóstica da presente metodologia, desde que observada o limite de sensibilidade do método.

Substâncias interferentes:

- A amostra utilizada na determinação de proteínas na urina e no líquido deverá estar isenta de hemólise, devido à maior concentração proteica existente no sangue total.
- Células e partículas deverão ser removidas das amostras através de centrifugação, pois sua presença pode alterar a leitura final.
- Certas drogas também interferem nos níveis de proteínas da urina e do líquido. Para controle de tais interferências, recomenda-se que o paciente seja questionado quanto ao uso de medicamentos.
- Resquícios de detergentes podem introduzir alterações significativas.
- O uso de conservantes para urina tais como, ácido clorídrico, ácido benzóico ou timol podem causar resultados falsamente diminuídos.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Burtis, C.A., Ashwood, E.R.: Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3ª ed. 1999.
- Doles: dados de arquivo.
- Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Press, 1997.
- Henry, J.B.H.: Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 20ª ed. 2001.
- Hitachi 726 automated analyzer. Clin Chem 1986; 32:1551-1544.

- Orsonneau JL et al. An improved pyrogallol red-molybdate method for determining total urinary protein. Clin Chem 1989; 35:2233-2236.
- Tibúrcio, H.M.: Controle interno da qualidade analítica, 1aed. março/1995.
- Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 4th ed. AACC Press, 1995.
- Watanabe N et al. Urinary Protein as measured with a pyrogallol red-molybdate complex, manually and in a Hitachi 726 automated analyzer. Clin.chem.1986;32:1551-1544

TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO

As garantias do fabricante ao consumidor seguem estritamente as relacionadas na Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1.990 - **Código de Defesa do Consumidor**. Todos os reagentes que compõem este sistema para diagnóstico são garantidos na sua performance, reprodutibilidade e qualidade até a data de vencimento dos mesmos, se obedecidas as condições abaixo:

- 1.O usuário do sistema seguir, rigorosamente, o procedimento técnico.
- 2.As condições de armazenamento deverão estar de acordo com o estabelecido nas instruções de uso.
- 3.Os materiais necessários e não fornecidos deverão estar em boas condições técnicas.

Todos os produtos que apresentarem problemas técnicos comprovados serão substituídos sem ônus para o consumidor.

Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios Ltda.
CNPJ: 01.085.513/0001-05
Rodovia BR 153, Km 1273, Lt.07, Chácara Retiro
Caixa Postal 1051
CEP: 74001-970 Goiânia - GO - Brasil
e-mail: doles@doles.com.br
www.doles.com.br

M.S.: nº 10231810090

Revisão: 17 (06/2009)

NBR ISO 9001:2000

**Sistema da Qualidade
certificado desde 1999**

