

FINALIDADE

Sistema colorimétrico para determinação das mucoproteínas no soro.

Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO

Proteínas são precipitadas em solução de Ácido Perclórico 0,6M, restando a fração glicoproteica chamada "seromucoide" (mucoproteínas). Posteriormente a fração glicoproteica é dissolvida e quantificada em termos de tirozina.

PARTICULARIDADES DO SISTEMA

Mucoproteínas Doles é uma modificação da técnica de Winzler com alterações propostas por Weimer e Moshim. A utilização de Ácido Perclórico 1,8M permite a precipitação das proteínas séricas, ficando a fração mucoproteica seletivamente em solução. A utilização de solução alcalina e reagente de Folin standardizados permitem a obtenção de resultados precisos.

METODOLOGIA

Winzler modificado.

REAGENTES

Ácido Perclórico : solução aquosa 1,8M de Ácido Perclórico.

Reagente fosfotúngstico: solução de Ácido Fosfotúngstico 0,009M em Ácido Clorídrico 2M.

Reagente de Folin: solução aquosa contendo por litro: 0,25M de Tungstato de Sódio, 0,086M de Molibdato de Sódio, 0,7M de Ácido Fosfórico, 0,92M de Ácido Clorídrico, e 0,97M de Sulfato de Lítio.

Solução padrão 6mg/dL: solução aquosa correspondendo a 6mg/dL de mucoproteínas em termos de Tirozina.

Reagente 080-5: solução 2M de Carbonato de Sódio.

APRESENTAÇÃO

Ácido Perclórico 1,8M	1 x 66 mL
Reagente fosfotúngstico	1 x 16 mL
Reagente de Folin	1 x 10 mL
Solução padrão 6mg/dL	1 x 3 mL
Reagente 080-5	1 x 26mL

NÚMERO DE TESTES

26 testes

EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS

- Espectrofotômetro ou fotocolorímetro capaz de medir a absorvância em 680nm ou filtro vermelho.
- Tubos de centrífuga.
- Pipetas graduadas.
- Pipeta semiautomática 20µL.
- Ponteiras descartáveis.
- Água destilada ou deionizada.
- Centrífuga.
- Cronômetro.
- Frasco plástico com capacidade de 250mL.
- Solução fisiológica.
- Papel de filtro de alta retenção.
- Funil de vidro.
- Proveta de 250mL.

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Ácido Perclórico 1,8M: armazenar à temperatura ambiente (20-30°C), em local ventilado e ao abrigo da luz. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, obedecidas as condições de armazenamento.

Reagente fosfotúngstico: armazenar à temperatura ambiente (20-30°C), em local ventilado e ao abrigo da luz. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, obedecidas as condições de armazenamento.

Reagente de Folin: armazenar à temperatura ambiente (20-30°C). Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, obedecidas as condições de armazenamento.

Solução padrão 6mg/dL: armazenar à temperatura ambiente (20-30°C) antes de abrir. Após abertura, armazenar bem vedado sob refrigeração (2-8°C).

Reagente 080-5: armazenar à temperatura ambiente (20-30°C). Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, obedecidas as condições de armazenamento.

Solução alcalina (solução 080-5 diluída): após reconstituição, armazenar em vasilhame plástico à temperatura ambiente (20-30°C). Estável por dois anos após sua reconstituição, obedecidas as condições de armazenamento e preparo.

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:



Corrosivo



Irritante

AMOSTRA

Soro. Estável por 7 dias, se armazenado sob refrigeração (2-8°C). Não é recomendado usar plasma, pois podem-se obter resultados falsamente diminuídos.

Todas as amostras biológicas devem ser consideradas como potencialmente infectantes.

PROCEDIMENTO TÉCNICO

Solução alcalina

Adicionar o conteúdo do **frasco 080-5** a uma proveta e completar o volume a **250mL** com água destilada. Transferir para um vasilhame plástico e identificar com o rótulo anexo. Estável por dois anos após sua reconstituição, obedecidas as condições de armazenamento e preparo.

Proceder como segue:

Desproteínização	T
Vide item 2 de "Limitações do Sistema".	
Solução fisiológica	4,2 mL
Amostra	0,8 mL
Ácido Perclórico 1,8M	2,5mL

Agitar fortemente. Deixar repousar por 10 minutos e filtrar em papel filtro altamente retentivo (ver item 3 de "limitações do sistema").

Precipitação das mucoproteínas	T
Filtrado etapa anterior	3,0mL
Reagente fosfotúngstico	0,5mL

Agitar e deixar repousar por 10 minutos. Centrifugar durante 5 minutos (3.000-4.000 r.p.m.). Decantar todo o sobrenadante. **Lavar o precipitado. Adicionar ao tubo 0,1mL de reagente fosfotúngstico e 0,5mL de água destilada, suspendendo o precipitado por agitação.** Centrifugar novamente, em alta rotação, durante 5 minutos.



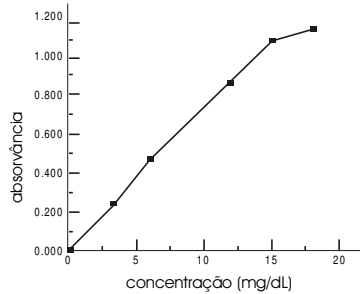
Decantar todo o sobrenadante, deixando posteriormente o tubo emborcado sobre o papel filtro para que o líquido restante esorra. Esse será o tubo **T (teste)** utilizado para colorimetria. Rotular um tubo de ensaio com **B (branco)** e **P (padrão)**.

Proceder como segue:

Colorimetria	B	T	P
Solução alcalina	4,0mL	4,0mL	4,0mL
Solução padrão	-	-	20µL
Reagente de Folin	0,2mL	0,2mL	0,2mL

Agitar imediatamente todos os tubos e colocar em **banho maria**, a **37°C**, durante **15 minutos**. Retirar do banho maria e ler absorvâncias de **P** e **T** em espectrofotômetro ou fotocolorímetro, em **680nm** ou **filtro vermelho**, ajustando o zero com o **branco (B)**. A cor permanece estável por 60 minutos à temperatura ambiente (20-30°C).

CURVA DE CALIBRAÇÃO



Padrão	Absorvância	Conc. (mg/dL)
1	0.000	0
2	0.220	3
3	0.442	6
4	0.882	12
5	1.100	15
6	1.170	18

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 "Ultrospec III", Pharmacia Biotec, comprimento de onda de 680nm 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.
- **O kit de Mucoproteínas 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.**
- **A reação é linear até 15mg/dL (ver curva acima). Obtendo-se valores mais elevados, diluir a amostra com solução fisiológica e procede-se à nova dosagem. Multiplicar o valor encontrado pelo fator de diluição.**
- **O fator deve ser refeito periodicamente e a cada lote do produto.**
- Os diversos padrões utilizados foram ajustados segundo a metodologia original de Winsler (1).

CÁLCULOS

$$\text{Mucoproteínas (mg/dL)} = \frac{\text{absorvância T}}{\text{absorvância P}} \times 6$$

Exemplo:

Leituras:

Teste (T) : 0,140

Padrão (P) : 0,442

$$\text{Mucoproteínas (mg/dL)} = \frac{0,140}{0,442} \times 6 = 1,90$$

Como o sistema colorimétrico segue a lei de Beer, basta a determinação de um fator (F).

$$\text{Fator (F)} = \frac{6}{\text{absorvância P}}$$

$$\text{Mucoproteínas (mg/dL)} = \text{absorvância T} \times \text{fator}$$

Para determinação do fator, recomenda-se dosar em triplicata o padrão, ler as absorvâncias e tirar a média aritmética das mesmas.

Exemplo:

Leituras:

Teste (T) : 0,140

Padrão (P) : 0,443; 0,441; 0,442

$$\text{Média aritmética} = \frac{0,443 + 0,441 + 0,442}{3} = 0,442$$

$$\text{Fator (F)} = \frac{6}{0,442} = 13,6$$

$$\text{Mucoproteínas (mg/dL)} = 0,140 \times 13,6 = 1,90$$

LIMITAÇÕES DO SISTEMA

1. 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.
2. **A desproteinização do soro por Ácido Perclórico 1,8M deve se processar à temperatura de 22-26 °C. Temperaturas elevadas provocam resultados finais artificialmente baixos.**
3. **A filtração deve ser feita em papel altamente retentivo (papel Whatman nº 50, Toyo nº 4, Green'S 807, SS589 - faixa azul). A centrifugação ou filtração em papel de filtro com outras características incorpora ao filtrado porções de proteínas precipitadas levando a resultados falsamente elevados.**
4. O soro deve ser previamente diluído em solução fisiológica e posteriormente precipitado como no item 1. A não observância desse detalhe leva a resultados irregulares.
5. Após a lavagem do precipitado, certificar-se de que a centrifugação tenha sido correta de maneira a compactar todo o precipitado no fundo do tubo. A permanência de parte do precipitado, em suspensão, no líquido residual levará à obtenção de resultados falsamente baixos por perda de material no processo de decantação.

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, aminas e agentes oxidantes, que deterioram os reagentes.
4. As pipetagens devem ser precisas.
5. O nível da água do banho maria deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio. A temperatura (37°C) deve ser rigorosamente observada.
6. O uso de soro controle de referência deve ser uma prática rotineira do laboratório. Recomenda-se utilizar um soro controle com valor na faixa de normalidade (**soro controle N - Doles**) e outro soro controle de valor elevado (**soro controle P - Doles**).

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: Segundo Winzler: 2,34 - 3,92mg/dL de mucoproteínas, em termos de tirozina.

SIGNIFICADO CLÍNICO

As mucoproteínas enquadram-se no grupo das glicoproteínas. A dosagem dos níveis de mucoproteínas adquire importância prática em patologia clínica para o diagnóstico diferencial de infecções sobretudo como sinal de atividade inflamatória. Os valores apresentam-se aumentados em condições patológicas associadas a processos inflamatórios, degenerativos, proliferativos ou traumáticos, como: neoplasias com metástases, doenças reumáticas, glomerulonefrites agudas, obstruções biliares ou infecções, agudas e crônicas. A diminuição da mucoproteína é constatada em insuficiências hepáticas graves, como na cirrose portal descompensada. No diabetes mellitus descompensado e na síndrome nefrótica, os valores da mucoproteína encontram-se, geralmente, diminuídos.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Foram realizados 42 testes em amostras cujo teor de mucoproteínas se situava no intervalo de 1,8 a 8,3mg/dL. Esses ensaios foram realizados em paralelo com uma metodologia de referência. A comparação do kit de Mucoproteínas Doles (Y) com a metodologia mencionada (X) deu origem à seguinte equação de regressão linear: $Y = 0,07 + 1,025X$, sendo o coeficiente de correlação 1,00.

Testes de recuperação mostram índice de recuperação de $99 \pm 5\%$.

O erro da média foi de 3,16%.

Repetitividade: foram realizadas 20 dosagens sucessivas, com 2 amostras, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2
Concentração (mg/dL)	3,96	8,49
Desvio padrão	0,13	0,27
Coefficiente de variação (%)	3,28	3,18

Reprodutibilidade: foram realizadas 20 dosagens, durante 20 dias consecutivos, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2
Concentração (mg/dL)	4,16	7,84
Desvio padrão	0,15	0,27
Coefficiente de variação (%)	3,61	3,44

Especificidade: as mucoproteínas são compostos de proteínas e carboidratos, presentes nas frações globulínicas. Quantidades variáveis de hexosaminas (glicosilamina e galactosamina), em teores superiores a 4%, entram em sua constituição. São de interesse clínico: a alfa-1-glicoproteína e a alfa-2-macroglobulina. A presente metodologia é específica para determinação das mucoproteínas totais.

Sensibilidade: a absorvância encontrada, de 0,036, corresponde a 0,5mg/dL de mucoproteínas, quando realizados os testes em espectrofotômetro, em 680nm. A sensibilidade do sistema está diretamente relacionada com a do aparelho utilizado no laboratório.

Diluição da matriz: estudos sucessivos de diluição da matriz mostraram que não há interferência na sensibilidade diagnóstica da presente metodologia de Winzler modificado.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Winzler, R.J.: *Methods of Biochemical Analysis*, vol.2 ed. Glick, Interscience, N.Y., p 279, 1965.
- Tibúrcio, H.M.: *Controle interno da qualidade analítica*, 1ªed. março/1995.
- Doles: dados de arquivo.

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
 CEP: 74001-970 Goiânia - GO - Brasil
 Caixa Postal 1051
 e-mail: doles@doles.com.br

M.S.: nº 10231810009

Revisão: 12 (07/2009)

NBR ISO 9001

**Sistema da Qualidade
 certificado desde 1999**

