

## FINALIDADE

Sistema colorimétrico para determinação de proteínas totais no soro e outros líquidos biológicos (pleural, ascítico, pericárdico e sinovial).

**Somente para uso diagnóstico in vitro.**

## PRINCÍPIO

O reagente do biureto, uma solução de Sulfato de Cobre, Citrato trissódico, Carbonato de Sódio e Hidróxido de Sódio, reage com as proteínas da amostra, formando um complexo corado de cor violeta, que é proporcional à concentração protéica da amostra.

## PARTICULARIDADES DO SISTEMA

O reagente de biureto modificado, isoladamente, não reage com as proteínas. Só após sua alcalinização dá-se o desenvolvimento de reação corada. Esse detalhe permite a dosagem em série de inúmeros soros. Particularidades na formulação do reagente de biureto permitem que a reação corada se desenvolva integralmente em 5 minutos.

## METODOLOGIA

Biureto modificado.

## REAGENTES

**Reagente de biureto (solução concentrada):** cada frasco contém 100mL da seguinte solução: Citrato Trissódico 0,57M, Carbonato de Sódio 1,05M e Sulfato de Cobre 0,052M.

**Hidróxido de Sódio 6M:** solução aquosa de Hidróxido de Sódio 6M.

**Solução padrão 4g/dL:** solução de albumina bovina estabilizada com azida sódica 1:1000.

## APRESENTAÇÃO

Reagente de Biureto (concentrado)	100mL
Hidróxido de Sódio 6M	20mL
Solução padrão 4g/dL	3mL

## NÚMERO DE TESTES

Manual	200 testes
Automação	1.800 testes

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

## MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS

- Frasco plástico com capacidade volumétrica de 500mL.
- Água destilada ou deionizada.
- Espectrofotômetro ou fotocolorímetro com capacidade de medir absorvância em 550nm ou filtro verde.
- Tubos de ensaio.
- Pipetas graduadas.
- Pipeta semiautomática de 50µL.
- Ponteiras descartáveis.
- Cronômetro.
- Balão volumétrico de 500mL.

## ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

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

**Reagente de biureto (solução de uso):** armazenar à temperatura ambiente (20-30°C), em frasco plástico. Estável por 2 anos após o preparo da solução de uso, se obedecidas as condições de armazenamento e preparo.

**Hidróxido de Sódio 6M:** armazenar à temperatura ambiente (20-30°C). Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco.

**Solução padrão 4g/dL:** armazenar à temperatura ambiente (20-30°C), enquanto lacrado. Após a abertura, armazenar bem vedado, à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco.

## 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 contato direto 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, líquidos (pleural, ascítico, pericárdico e sinovial). O sangue deve ser colhido com o mínimo de estase. A amostra deverá estar límpida (isenta de hemólise). Permanece estável por 3 dias, à temperatura de 2-8°C, ou por 7 dias, quando armazenado à 10°C negativos. Soro com acentuada hemólise (>400mg/dL) promove resultados falsamente elevados das proteínas totais.

**Todas as amostras biológicas devem ser consideradas como potencialmente infectantes.**

## PROCEDIMENTO TÉCNICO

### Preparo da solução biureto de uso:

Adicionar a solução de um frasco de biureto (concentrada) a um balão volumétrico de 500mL e acertar o volume até a marca utilizando água destilada ou deionizada. Homogeneizar bem e transferir para um vasilhame plástico identificado com o rótulo anexo. A solução biureto de uso apresenta a seguinte composição: Citrato Trissódico 0,114M, Carbonato de Sódio 0,21M e Sulfato de Cobre 0,01M. Estável por 2 anos, à temperatura de 20-30°C.

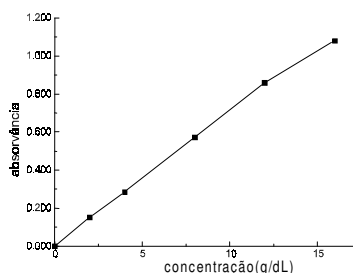
Identificar 3 tubos de ensaio com **B (branco), T (teste) e P (padrão)**.

### Proceder como segue:

	B	T	P
Reag. de biureto (sol. uso)	2,5mL	2,5mL	2,5mL
Amostra	-	50µL	-
Solução padrão	-	-	50µL
Hidróxido de Sódio	2 gotas	2 gotas	2 gotas

Homogeneizar e deixar em repouso durante cinco minutos, à temperatura ambiente (20-30°C). Ler o teste e o padrão em espectrofotômetro ou fotocolorímetro, em **550nm** ou **filtro verde**, acertando o zero com o **branco**. A cor final da reação permanece estável por 30 minutos, à temperatura ambiente (20-30°C).

## CURVA DE CALIBRAÇÃO



Padrão	Absorvância	Conc. (g/dL)
1	0.000	0
2	0.151	2
3	0.285	4
4	0.572	8
5	0.860	12
6	1.080	16

**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 550nm 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. As curvas de calibração são utilizadas para substituir os cálculos matemáticos na determinação das concentrações das amostras. A leitura da amostra é localizada no gráfico apropriado e a concentração correspondente, determinada a partir da curva. Tal procedimento será válido se a leitura da amostra estiver no intervalo da linearidade da reação.
- **A reação é linear entre 0 e 12g/dL (ver curva acima). Obtendo-se valores mais elevados, dilui-se a amostra com solução fisiológica e procede-se à nova dosagem. Multiplicar o valor encontrado pelo fator de diluição.**
- **O kit de Proteínas Totais Doles possui padrão no intervalo de linearidade da metodologia Biureto modificado. 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 deve ser refeito periodicamente e a cada lote do produto.**
- As soluções padrão utilizadas na montagem da curva de calibração foram rastreadas contra "Protein Standard Solution", cat. Nº 540-10, com a proteína total de 8g/dL e albumina de 5g/dL, procedente de "Sigma Chemical Company".

## CÁLCULOS

$$\text{Proteínas totais (g/dL)} = \frac{\text{absorvância teste}}{\text{absorvância padrão}} \times 4$$

**Exemplo:**

Leituras:

Padrão : 0,285

Teste : 0,379

$$\text{Proteínas totais (g/dL)} = \frac{0,379}{0,285} \times 4 = 5,32$$

Como a reação corada segue estritamente a lei de Beer, basta a determinação de um fator (F) para cálculo dos resultados.

$$\text{Fator (F)} = \frac{4}{\text{absorvância do padrão}}$$

$$\text{Proteínas totais (g/dL)} = \text{absorvância do teste} \times F$$

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

**Exemplo:**

Leituras:

Padrão : 0,285 ; 0,286, 0284

$$\text{Média aritmética} = \frac{0,285 + 0,286 + 0,284}{3} = 0,285$$

$$\text{Fator (F)} = \frac{4}{0,285} = 14,03$$

Leitura do teste = 0,379

Proteínas totais (g/dL) = 0,379 x 14,03 = 5,31

## EXPRESSÃO DOS RESULTADOS EM UNIDADES DO SISTEMA INTERNACIONAL (S.I.)

Para transformar proteínas totais (g/dL) em Unidades S.I., multiplicar o valor encontrado por 10, transformando-o em g/L.

Exemplo: Proteínas totais (g/dL) x 10 = Proteínas totais (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.
- A metodologia não é adequada para a dosagem de proteínas na urina e no líquido. Para essas amostras, utilizar o **Kit Microprote Doles**, específico para líquido e urina.
- O estase venoso durante o processo de coleta da amostra pode resultar em valores elevados, bem como hemólise, lipemia e hiperbilirrubinemia.

## 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. O uso de soros 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:

### Soro

Adultos	6,0 - 8,0g/dL
Crianças	6,2 - 8,0g/dL
Prematuros	4,3 - 7,6g/dL
Recém-nascidos	4,6 - 7,4g/dL

## SIGNIFICADO CLÍNICO

As proteínas totais apresentam-se aumentadas em casos de desidratação, mieloma múltiplo, macroglobulinemia, crioglobulinemia, lupus eritematoso sistêmico, cirrose hepática, sarcoidose, linfogranuloma e leishmaniose visceral.

As proteínas totais apresentam-se diminuídas em casos de síndrome nefrótica, hiperidratação, queimaduras severas, desnutrição, insuficiência renal, distúrbios da síntese proteica e na síndrome de má absorção.



### CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Foram realizados 45 testes em amostras cujo teor de proteínas se situava no intervalo de 2 a 10,8 g/dL. Esses ensaios foram realizados em paralelo com uma metodologia de referência. A comparação do kit de Proteínas Totais Doles (Y) com a metodologia acima mencionada (X) deu origem à seguinte equação de regressão linear:  $Y = 0,23 + 0,989X$ , sendo o coeficiente de correlação 0,99.

Testes mostraram uma recuperação de  $99 \pm 3,0\%$ .

O erro da média foi de 1,97%.

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

	Amostra 1	Amostra 2
Concentração (g/dL)	6,51	8,82
Desvio padrão	0,12	0,11
Coefficiente de variação (%)	1,84	1,25

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

	Amostra 1	Amostra 2
Concentração (g/dL)	5,98	9,31
Desvio padrão	0,15	0,20
Coefficiente de variação (%)	2,51	2,15

**Especificidade:** a metodologia de Biureto é específica para determinação de proteínas no soro. Não há reações com aminoácidos e díptidos.

**Sensibilidade:** a absorvância encontrada, de 0,036, corresponde a 0,5g/dL de proteínas totais no soro, quando realizados os testes em espectrofotômetro, a 550nm. A sensibilidade do sistema está diretamente relacionada com a do aparelho utilizado no laboratório. A presente metodologia não é sensível para determinação de proteínas totais na urina e no LCR.

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

**Substâncias interferentes:** soro hemolisado e medicamentos como esteroides anabólicos, corticoesteroides, digitálicos e tiroxina, promovem resultados falsamente elevados das proteínas totais. Os estrogênios, laxativos e contraceptivos orais, as reduzem. Quando do uso de plasma, os valores encontrados são mais elevados devido à presença do fibrinogênio.

### BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Weichselbaum. T.F.: Amer J.: *Clin. Path.* 10:49, 1946.
- Henry, R.J. Sobel, C. and S. Berkman: *Anal. Chem.*, 29: 1941, 1957.
- Giese, R.W.; Annino, J.S.: *Química Clínica: Princípios e métodos*, 191-195, 1978.
- Jacobs D.S., Kasten B.L; Demott. W.R., Walfson W.L.: *Laboratory test handbook*, 2ª ed.; 316-317, 1990.
- Cockayne, S; Anderson, S.C.: *Clinical chemistry: concepts chemistry*, 196-197, 1993.
- 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

Caixa Postal 1051

CEP: 74001-970 Goiânia - GO - Brasil

e-mail: doles@doles.com.br

M.S.: nº 10231810037

Revisão: 11 (07/2009)

### NBR ISO 9001

**Sistema da Qualidade certificado desde 1999**

