

Utilização prevista

Para a determinação quantitativa de proteína total na urina. **Rx Only.**

Relevância clínica

A presença de proteína na urina é um indicador muito sensível de doenças renais. O aumento das quantidades de proteína pode ocorrer de quatro maneiras: aumento da permeabilidade glomerular; reabsorção tubular defeituosa; aumento da concentração plasmática de uma proteína de baixo peso molecular anormal; e secreção anormal de proteína no trato urinário¹. A albuminúria, aumento das quantidades de albumina na urina, foi reconhecida como um indicador precoce de danos renais na diabetes que pode ser revertida se for detetada e tratada precocemente.²

História dos métodos

Foram descritos diversos métodos de determinação das concentrações de proteína nos fluidos biológicos. Estes métodos baseiam-se em procedimentos colorimétricos, turbidimétricos, eletroforéticos ou imunológicos.^{3,4} Os métodos de ligação de corante caracterizam-se por uma boa precisão e sensibilidade. O método de Azul de Coomassie⁵ é muito sensível, mas os reagentes mancham as peças de vidro e o plástico.

Este método baseia-se no procedimento desenvolvido por Fujita⁶ e Watanabe.⁷ É um método colorimétrico sensível de ligação de corante que utiliza Vermelho de Pirogalol. O método raramente mancha as cuvetes ou os tubos de plástico e pode ser automatizado.

Princípio

O Vermelho de Pirogalol é combinado com ácido de molibdênio num pH baixo. Quando o complexo é combinado com proteína, forma-se uma cor púrpura azulada. O aumento da absorvância a 600 nm é diretamente proporcional à concentração de proteína na amostra.

Reagentes

1. REAGENTE DE MICROPROTEÍNA: Contém tampão, Vermelho de Pirogalol 0,067 mmol/L, estabilizador de molibdato de sódio 0,153 mmol/L, agentes tensoativos e conservante.
2. SOLUÇÃO PADRÃO DE PROTEÍNA: Contém albumina 50 mg/dL em solução salina com azida de sódio a 0,05% como conservante.

Preparação dos reagentes

O Reagente de Microproteína e a Solução Padrão de Proteína são fornecidos prontos a utilizar.

Armazenamento dos reagentes

Armazene o Reagente de Microproteína e o Padrão de Proteína refrigerados (2-8°C). O reagente e o padrão mantêm-se estáveis até à data de validade indicada nos rótulos.

Precauções

1. O Reagente de Microproteína destina-se apenas a diagnóstico *in vitro*.
2. Devem ser seguidas as precauções normais de manuseamento de reagentes de laboratório.
3. O Padrão de Proteína contém azida de sódio. Não ingerir. Pode reagir com canalização de chumbo ou cobre, formando azidas de metal altamente explosivas. Aquando da eliminação, escoje com água abundante para evitar a acumulação de azida.

Deterioração do reagente/padrão

O reagente e o padrão devem ser transparentes. Não utilizar se estiverem turvos. A incapacidade de alcançar os valores de controlo analisados pode indicar deterioração do reagente e/ou do padrão. Não utilizar se a absorvância do reagente a 600 nm for inferior a 0,100.

Colheita e armazenamento de amostras

Recomenda-se que a colheita de amostras seja realizada de acordo com o documento NCCLS M29-T2. As amostras que contenham matéria particulada visível devem ser clarificadas por centrifugação antes do teste.

URINA: Os testes são realizados em amostras de 24 horas. A urina não deve ser colhida durante períodos de exercício devido ao seu efeito na concentração de albumina. As determinações de proteína devem ser realizadas com amostras

frescas. Se não for possível realizar o teste com urina fresca, as amostras podem ser armazenadas a -20°C durante um período máximo de um ano.⁸ NOTA: A hemoglobina pode aumentar os valores de proteína total obtidos, NÃO UTILIZE amostras que contenham sangue.

Interferências

Recomenda-se não utilizar amostras de urina com adição de conservantes, pois foi demonstrado que alguns conservantes adicionados, como HCL e ácido benzoico, interferem no ensaio de proteína, fornecendo resultados erradamente baixos.⁷ Verificou-se que a bilirrubina até um nível de 20 mg/dL e o ácido ascórbico até um nível de 3,0 mg/dL não interferem no ensaio. (Menos de 3,0% de desvio para amostras no intervalo de 130,0-132,0 mg/dL e menos de 17% para amostras medidas no intervalo de 9,2-12,5 mg/dL) Uma vez que a hemoglobina é uma proteína, aumenta os valores de proteína total obtidos. Apurou-se que a variação de pH não tem qualquer efeito na determinação de proteína total. Os efeitos da variação da gravidade específica não foram avaliados. Alguns medicamentos e fármacos podem interferir, consulte Fujita.⁶

Materiais fornecidos

1. Reagente de Microproteína
2. Solução Padrão de Proteína

Materiais necessários, mas não fornecidos

1. Dispositivos de pipetagem precisos.
2. Tubos de ensaio/suporte
3. Banho-maria ou bloco de aquecimento (37°C)
4. Temporizador.
5. Espectrofotómetro com capacidade de leitura a 600 nm.

Procedimento (automatizado)

Estão disponíveis procedimentos de aplicação para diversos instrumentos automatizados discretos. Contacte a Assistência Técnica.

Procedimento (manual)

1. Coloque rótulos nos tubos de ensaio com a indicação "Branco", "Controlo", "Padrão", "Paciente", etc.
2. Coloque 1,0 mL de reagente de microproteína em cada tubo com uma pipeta.
3. Deixe que todos os tubos atinjam uma temperatura de 37°C.
4. Com uma pipeta, coloque 0,02 mL (20µL) de água desionizada, padrão, controlos e amostras nos tubos devidamente rotulados.
5. Deixe os tubos incubarem a 37°C durante 5 minutos.
6. Passados 5 minutos, defina o espectrofotómetro a 600 nm e reponha o instrumento a zero com o tubo BRANCO.
7. Leia e regista a absorvância (Abs) do padrão, controlos e amostras.
8. Para determinar a concentração de microproteína das amostras, consulte a secção "Cálculos".

Calibração

Utilize um padrão de proteína aquoso (rastreadável ao NIST SRM 927c).

Controlo da qualidade

O Controlo de Qualidade padrão deve ser aplicado a este procedimento. Devem ser utilizados controlos de urina disponíveis comercialmente (2 níveis) para monitorizar as variações diárias aceitáveis. É atingido um nível satisfatório de desempenho quando os valores de análises obtidos se encontram dentro do intervalo aceitável estabelecido pelo laboratório.

Cálculos

Os valores de proteína são expressos em mg/dL.

$$\text{Proteína (mg/dL)} = \frac{\text{Abs Desc}}{\text{Abs. de Pdr.}} \times \text{Conc. de Pdr.}$$

Em que:

Abs Desc = A absorvância da amostra desconhecida

Abs. de Pdr. = A absorvância do padrão

Conc. de Pdr. = Concentração do padrão (50 mg/dL)

Exemplo:

Abs Desc = 0,085

Abs de Pdr = 0,195

Conc. de Pdr. = 50 mg/dL

Conjunto de Reagentes de Microproteína Pointe

$$\text{Proteína (mg/dL)} = \frac{0,085}{0,195} \times 50 = 21,8 \text{ mg/dL}$$

Para determinar a proteína urinária de 24 horas, meça o volume total de urina de 24 horas em mL (VT) e analise o conteúdo de proteína na urina (mg/dL). Calcule a proteína urinária de 24 horas utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Proteína (mg/dia)} = \text{Proteína (mg/dL)} \times \frac{\text{VT}}{100}$$

Em que: VT = volume total de urina de 24 horas em mL
100 = converte mL/dia em dL/dia

Unidades do S.I.

Para converter os resultados em unidades do S.I., multiplique a concentração de microproteína (mg/dL) por 0,0100. Por exemplo, concentração de microproteína = 21,8 mg/dL x 0,0100 = 0,218 g/L.

Valores esperados ^{6,7}

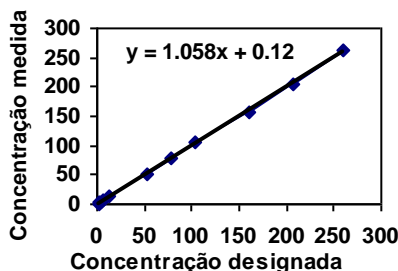
Proteína urinária de 24 horas 28 - 141 mg/dia
Urina aleatória Inferior a 10 mg/dL

NOTA: Cada laboratório deve confirmar a validade dos intervalos indicados para a população que atende.

Desempenho

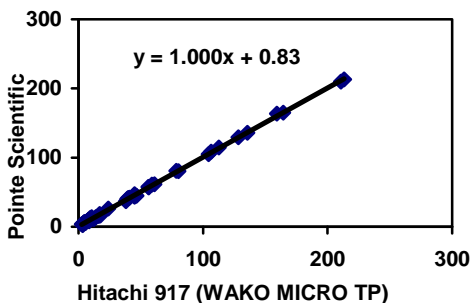
- Intervalo do ensaio: O procedimento de microproteína tem um intervalo de ensaio de 2,0 - 250 mg/dL. As amostras que excedem 250 mg/dL devem ser diluídas com um volume igual de solução salina isotônica e novamente submetidas a ensaio. Multiplique o resultado por 2 para compensar a diluição.
- A linearidade foi efetuada por meio de onze concentrações conhecidas entre 1,23 e 259,43 mg/dL. O estudo foi realizado num analisador Roche Hitachi 917. A recuperação gráfica é apresentada.

Gráfico de linearidade



- Sensibilidade: Com base numa resolução de absorvância do instrumento de 0,001, este procedimento tem uma sensibilidade de 0,250 mg/dL. Verificou-se que o limite de detecção era de 2,0 mg/dL quando a absorvância era lida bicromaticamente a 600/700 nm (analisador de química Hitachi 917).
- Comparação: Os estudos realizados entre o presente método e um método semelhante (Wako Autokit Micro TP efetuado no Hitachi 917) resultaram num coeficiente de correlação de 0,9997 e uma equação de regressão $y = 1,000x + 0,83$. Foram utilizadas no estudo 55 amostras com um intervalo de 2,5 - 213,3 mg/dL. A recuperação gráfica é apresentada.

Gráfico de correlação



- Precisão: Os estudos foram realizados num analisador Roche Hitachi 917. A precisão do ensaio foi avaliada na sequência de uma modificação do protocolo EPT-T2 do NCCLS. Os dados de precisão na mesma determinação foram obtidos analisando três amostras em réplicas de 20 no mesmo dia. Os dados entre determinações foram obtidos analisando três amostras em réplicas de cinco durante um período de três dias.

Urina na mesma determinação (N=20)			Urina entre determinações (N=20)		
Média	D.P.	% C.V.	Média	D.P.	% C.V.
8,7	0,7	8,6	10,2	0,9	8,6
121,8	2,1	1,7	127,0	1,6	1,2
240,3	1,7	0,7	242,5	2,4	1,0

Bibliografia

- Tietz, N.W., Textbook of Clinical Chemistry. W.B. Saunders, Philadelphia p. 608, 1986.
- Viberti, G.C., Pickup, J.C., Jarrett, R.J., Keon, H., N Engl J Med. 300:638-41 1979.
- Grant, G.H., Kachmer, J.F.: Fundamentals of Clinical Chemistry. N.W. Tietz, Editor, W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 358-374, 1976.
- Cannon, D.C., Olitzky, I., Inkpen, J.A.: Clinical Chemistry - Principles and Technics, 2nd Ed., R.J. Henry, D.C. Cannon, J.W., Winkelman, Editors, Harper & Row, New York, pp. 442-431, 1974.
- Pesce, M.A., Strande, C.S., Clin Chem 19:1265-1267, 1973.
- Fujita, Y., Mori, I., Kitano, S. Color reaction between pyrogallol red-molybdenum (VI) complex and protein. Bunseki Kagaku 32: E379-E386, 1983.
- Watanabe, N., Kamel, S., Ohkubo, A., Yamakna, M., Clin Chem 32:1551-1554, 1986.
- Tietz, N.W.; Clinical Guide to Laboratory Tests, W.B. Saunders, Phil. P.470, 1990.

Legenda dos símbolos

Utilizar até (AAAA-MM-DD)	LOT Lote e código
REF Número de catálogo	Fabricante
IVD Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>	Limite de temperatura
Consulte as instruções de utilização	CE Marcação CE
Rx Only: Utilização apenas mediante receita médica	
EC REP Representante autorizado na Comunidade Europeia	

REF P7582 Fabricado por HORIBA Instruments Incorporated 5449 Research Drive Canton, MI 48188 2°C **IVD**

Fabricado por HORIBA Instruments Inc: Pointe Brand
5449 Research Drive, Canton, MI 48188

Representante Europeu Autorizado:
Obelis s.a.
Boulevard Général Wahis 53
1030 Brussels, BÉLGICA
Tel.: (32)2.732.59.54 Fax: (32)2.732.60.03 e-mail: mail@obelis.net

Certificada para executar reagentes

Os reagentes Pointe são certificados para serem fabricados de acordo com parâmetros especificados. Qualquer produto de reagente Pointe que não cumpra as especificações até à data de validade indicada será regularizado imediatamente sem quaisquer custos.