

Método

Colorimétrico – Vermelho de Pirogalol.

Finalidade

Sistema para a determinação quantitativa da proteína na urina e líquor por método reação de ponto final.

Somente para uso diagnóstico in vitro.

Princípio

As proteínas presentes na amostra reagem com o Vermelho de Pirogalol e o Molibdato em meio ácido formando um complexo de cor azul, com o máximo de absorção em 600 nm (580 - 620 nm). A intensidade de cor formada é diretamente proporcional a concentração de proteína na amostra.

Significado Clínico

Os glomérulos funcionam como ultra filtros das proteínas plasmáticas, por isso um excelente método para avaliação de enfermidades renais é a determinação de proteínas na urina.

Normalmente pode ocorrer uma pequena excreção de proteínas na urina com os valores podendo chegar a 15 mg/dL ou 140 mg/24 horas. Quando ocorre detecção de quantidade anormal de proteínas na urina deve se realizar a medida quantitativa da excreção em 24 horas.

Valores aumentados de proteínas na urina levam ao diagnóstico de enfermidades renais tais como insuficiência renal, glomerulonefrite, síndrome nefrótica, tumores renais.

Os valores de proteinúria podem também estar elevados nas hemorragias e nos estados febris. Valores aumentados na urina, mesmo em indivíduos saudáveis, podem apresentar após exercícios físicos vigorosos e na desidratação. Na nefropatia diabética ocorre proteinúria intensa com valores de 3 a 4 g/24 horas.

Valores aumentados no Líquor são detectados nos tumores cerebrais, traumatismos craneano, pressão e hemorragias intracranianas e nas infecções bacterianas ou virais como meningite, encefalite e poliomielite. Outras situações agudas como stress físico ou febre, níveis altos de proteína na amostra também podem ser encontrados.

Reagentes

1 - Reagente de Cor - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Vermelho de Pirogalol 60 µmol/L, Molibdato de Sódio 40 µmol/L, surfactante e conservantes. (pH 2,50).

2 - Padrão - Conservar entre 2 e 8°C. Manter bem vedado para evitar evaporação. Contém: Proteínas 60 mg/dL, Azida Sódica 0,05 g/dL.

Estabilidade, Condições de Armazenamento e Transporte

Os reagentes são estáveis até a data de validade impressa no rótulo do produto e na embalagem externa quando conservados na temperatura recomendada, bem vedados e se evitado a contaminação durante o uso. A temperatura de armazenamento deverá ser de 2 a 8°C. Os produtos não deverão exceder as temperaturas entre 2 e 30°C por até 120 horas (5 dias) para fins de transporte. **Não congelar.**

Cuidados Especiais e Precauções

- As amostras a serem analisadas devem ser tratadas como material potencialmente infectante.
- Utilizar os EPI's de acordo com as Boas Práticas de Laboratório Clínico.
- O Reagente de Cor (1) contém azida sódica que é tóxica e irritante para pele e mucosa.
- As informações de Descarte, Segurança e Primeiros Socorros estão descritas na Ficha Individual de Segurança de Produtos Químicos (FISPC) deste produto, disponível em www.bioanalitica.com.br ou pelo telefone 0800 006 8111.
- Reagentes de lotes diferentes não devem ser misturados.
- Não trocar as tampas dos frascos dos reagentes, a fim de evitar contaminação cruzada.
- Não utilizar os reagentes quando se apresentarem turvos.
- Evitar deixar os reagentes fora das condições de armazenamento especificadas, quando os mesmos não estiverem em uso.
- O tempo de reação, pipetagens e temperatura de trabalho são muito importantes para obtenção de resultados corretos.
- Usar pipetas de vidro e ponteiras descartáveis específicas para cada amostra, controle, padrão/calibrador e reagente.
- O nível de água do banho-maria deve ser superior ao dos tubos de ensaio que contém as reações.

Materiais Necessários e Não Fornecidos

- Analisador bioquímico automático, semiautomático ou espectrofotômetro;
- Pipetas de vidro e/ou automáticas;
- Ponteiras, estantes;
- Tubos de ensaio;
- Cronômetro;
- Banho-maria.

Amostra

A amostra de Urina é estável por 1 dia entre 15 e 30°C, 8 dias entre 2 e 8°C, e 1 mês a -20°C. A amostra de Líquor é estável por 1 dia entre 15 e 30°C, 6 dias entre 2 e 8°C, e 1 ano a -20°C.

Para descarte dos reagentes e materiais biológicos devem-se seguir as normas locais, estaduais ou federais de proteção ambiental.

Interferências e Limitações

Hematuria produz resultados falsamente elevados. A presença de detergentes na vidraria pode alterar significativamente os resultados das análises.

Concentrações de hemoglobina até 100 mg/dL não produzem interferências significativas. Valores de hemoglobina maiores que 100 mg/dL produzem interferências significativas nas amostras com resultados falsamente elevados.

Preparação dos Reagentes

Reagente pronto para uso.

Procedimento Técnico

Equipamentos Automáticos

Para determinação em equipamento automático, verificar no site www.bioanalitica.com.br

Método de Ponto Final

Identificar 3 tubos de ensaio: B (Branco), T (Teste), P (Padrão) e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Amostra		0,05 mL	
Água deionizada	0,05 mL		
Padrão (2)			0,05 mL
Reagente de Cor (1)	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Homogeneizar bem e colocar em banho-maria 37 °C por 5 minutos. Ler a absorbância do Teste e do Padrão em 600 nm (580 - 620 nm), acertando o zero com o Branco. A cor é estável por 30 minutos.

Esta técnica é adequada para fotômetros cujo volume mínimo de solução para leitura é igual ou menor que 1,0 mL. Verificar a necessidade de ajuste do volume, e modificar proporcionalmente para não alterar os cálculos e o desempenho do teste. Volumes de amostra menores que 0,01 mL são críticos em aplicações manuais, pois aumentam a imprecisão da medição.

Cálculos

Proteína (mg/dL) = (Absorbância do Teste ÷ Absorbância do Padrão) × Concentração do Padrão

Fator de Calibração = Concentração do Padrão ÷ Absorbância do Padrão

Exemplo com Padrão

Absorbância do Teste = 0,136

Absorbância do Padrão = 0,380

Concentração do Padrão = 60 mg/dL

Proteína = $(0,136 \div 0,380) \times 60 = 21,5 \text{ mg/dL}$

Exemplo com fator de Calibração

$F_c = 60 \div 0,380 = 157,9$

Proteína = $0,136 \times 157,9 = 21,5 \text{ mg/dL}$

Dosagem da Proteína em Urina de 24 horas

Efetuar a análise da urina de 24 horas utilizando uma amostra do volume total. Multiplicar o resultado obtido pelo volume total urinário (mL) e dividindo o resultado por 100.

Proteína (mg/24 h) = $(\text{mg/dL} \times \text{volume urinário em mL}) \div 100$

Os resultados serão expressos em mg/24h.

Características do Desempenho

Comparação de Métodos

O método foi comparado com outro produto com metodologia semelhante através de 20 amostras de soro humano. Através de modelos estatísticos, os resultados foram analisados e resultaram na equação de regressão linear onde Método Bioanalítica (y) = -0,623 + 1,090* Método comparativo (x) e coeficiente de correlação igual a 0,992.

Sensibilidade

Uma amostra isenta de proteínas foi utilizada para calcular o limite de detecção do ensaio. A média encontrada foi 1,500 mg/dL equivalente a 20 determinações, com desvio padrão de 0,1657 mg/dL. A sensibilidade, que indica o limite de detecção do método, corresponde à média mais 3 vezes o desvio padrão, que é igual a 1,9940 mg/dL.

Linearidade

A reação é linear até 100 mg/dL. Para amostras com valores acima de 100 mg/dL, diluir a amostra com Cloreto de Sódio 150 mmol/L (0,85%), repetir a dosagem e multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição.

Repetitividade

A repetitividade foi calculada a partir de 20 determinações sucessivas, utilizando 3 amostras com concentrações diferentes, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração Média (mg/dL)	6,84	57,62	90,61
Desvio Padrão (mg/dL)	0,34	0,30	1,43
Coeficiente de Variação (%)	4,98	0,52	1,58

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi calculada a partir de 20 determinações sucessivas durante 20 dias consecutivos, utilizando 3 amostras com concentrações diferentes, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração Média (mg/dL)	9,14	51,69	111,40
Desvio Padrão (mg/dL)	0,09	0,24	1,39
Coeficiente de Variação (%)	1,01	0,47	1,25

Valores de Referência

Estes valores de referência devem ser usados apenas como orientação. Sugere-se que cada laboratório estabeleça seus próprios valores para população atendida. Os resultados dos testes devem ser analisados por um profissional responsável.

Líquor - Adultos: 15 a 45 mg/dL

Crianças e adolescentes:

0 a 30 dias: 0 a 153 mg/dL

31 a 90 dias: 15 a 93 mg/dL

Até 2 anos: 15 a 48 mg/dL

Acima de 2 anos: 15 a 45 mg/dL

Urina - Crianças e adultos:

Amostra aleatória: Até 15 mg/dL

Urina de 24 horas: 28 a 141 mg/24 horas

Para converter os valores de mg/dL em g/L (SI) multiplicar por 0,01.

Controle Interno da Qualidade

O laboratório clínico deve possuir um programa interno de controle da qualidade, para assegurar que todos os procedimentos, normas, limites e tolerância para variações sejam claramente definidos. Ressaltamos que todos os sistemas de medição apresentam uma variabilidade analítica, que deve ser monitorada pelos laboratórios. Portanto, é recomendável a utilização de controles, que permitem avaliar a precisão e a exatidão das dosagens. Sugere-se utilizar soluções estabilizadas da linha de controle e calibradores Bioanalítica.

Observações

- A limpeza e secagem adequadas do material usado são fatores fundamentais para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
- A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de agentes contaminantes. A limpeza da vidraria deve ser feita com detergente neutro. O enxágue deve ser exaustivo sendo os últimos com água destilada ou deionizada.
- A água utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes e usar nas medições, a água deve ser do Tipo II, com resistividade > 1 megaohms/ cm ou condutividade < 1 microsiemens /cm e concentração de silicatos < 0,1 mg/L. Para o enxágue inicial da vidraria, a água pode ser do Tipo III, com resistividade > 0,1 megahoms ou condutividade < 10 microsiemens.

No enxágue final, utilizar água do Tipo II. Coluna deionizadora com sua capacidade saturada libera água alcalina, vários íons e também substâncias com grande poder de oxidação ou redução que deterioram os reagentes em poucos dias ou mesmo horas, alterando de maneira imprevisível os resultados. Assim, é fundamental estabelecer um programa de controle da qualidade da água.

Referências Bibliográficas

- Dilena BA, Penberthy LA, Fraser CG. Clin Chem 1983; 29:553-7.
- McElderry LA, Tarbitt IF, Cassells – Smith AJ. Clin Chem 1982; 28:356-60.
- Boege F. Urinary proteins. In: Thomas L. Clinical Laboratory Diagnostics. 1 ed. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft; 1998. p. 382-400.
- Watanabe N, Kamei S, Ohkubo A, Yamanaka M, Ohsawa S, Makino K et al. Clin Chem 1986; 32:1551-54.
- Westgard JO, Groth T. Clin Chem 1981; 27:493-501.
- Pesce MA, Strande CS. Clin Chem 1973; 19:1265-67.
- Orsonneau JL, Douet P, Massoubre C, Lustenberger P, Bernard S. An improved pyrogallol red-molybdate method for determining total urinary protein. Clin Chem 1989; 35:2233-6.
- Bioanalítica: Dados internos de arquivo do P&D.

Termos e Condições de Garantia

A Bioanalítica Diagnóstica garante o desempenho e a qualidade deste produto, dentro das especificações, até a data de expiração indicada nos rótulos, desde que utilizados, armazenados e transportados nas condições adequadas.

Apresentações

Ref.	Volume	Reagente 1	Reagente 2
BA331-1	25 mL	25 mL	1 x 25 mL
BA331-2	50 mL	50 mL	2 x 25 mL

Bioanalítica Diagnóstica S/A

Rua Álvares da Silva, 12 - União

CEP: 31160-360 – Belo Horizonte MG - Brasil

Tel. +55 31 3657-0051

www.bioanalitica.com.br

E-mail: bioanalitica@bioanalitica.com.br

CNPJ: 20.264.948/0001-61 – Indústria Brasileira

SAC: 0800 006 8111

E-mail: sac@bioanalitica.com.br

Revisão: Outubro / 2022.