

Finalidade

Método colorimétrico para a determinação de proteínas totais em soro.

Significado clínico

As proteínas são compostos orgânicos macromoleculares, amplamente distribuídos no organismo e especialmente para a vida. Atuam como elementos estruturais e de transporte e aparecendo como enzimas, hormônios, anticorpos, fatores coagulantes, etc.

No plasma, as proteínas contribuem a manter o volume de fluido circulante, transportam substâncias relativamente não solúveis e atuam na inativação de compostos tóxicos e na defesa contra agentes invasores.

A determinação de proteínas totais é útil para o monitoramento de mudanças produzidas por diferentes doenças.

Em condições patológicas como a perda renal, desnutrição, infecções prolongadas, etc., apresentam-se as hipoproteïnemias, no entanto, em outras como o mieloma múltiplo, endocardite bacteriana e hemoconcentrações de diferentes origens, (ex. desidratação) observam-se as hiperproteïnemias.

Fundamentos do método

As ligações de peptídeos das proteínas totais reagem com o íon cúprico, em meio alcalino, para se obter um complexo de cor lilás com máximo de absorbância a 540 nm, cuja intensidade é proporcional à concentração de proteínas totais na amostra.

Reagentes fornecidos

A. Reagente A: complexo EDTA/Cu 13 mmol/L em hidróxido de sódio 875 mmol/L e alquil aril poliéter (AAP).

S. Padrão: solução de globulinas em estado nativo. A concentração especifica-se conforme o lote.

Instruções de uso

Reagentes fornecidos: prontos para uso.

Precauções

Os reagentes fornecidos são para uso diagnóstico "in vitro".

O Reagente A é corrosivo. H319: Provoca irritação ocular grave. H314: Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves. P262 Não pode entrar em contato com os olhos, a pele ou a roupa. P305 + P351 + P338: SE ENTRAR EM CONTATO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Caso use lentes de contato, retire-as, se for possível. Continuar enxaguando. P302 + P352: SE ENTRAR EM CONTATO COM A PELE: lavar com sabonete e água abundantes. P280 Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/óculos de proteção/proteção facial.

Utilizar os reagentes observando as precauções habituais de trabalho no laboratório de análises clínicas.

Todos os reagentes e as amostras devem ser descartadas conforme à regulação local vigente.

Estabilidade e instruções de armazenamento

Reagentes Fornecidos: são estáveis sob 15-30°C até a data do vencimento indicada na embalagem.

Amostra

Soro

a) Coleta: deve-se obter esteja livre de hemólise.

b) Aditivos: não são necessários.

c) Estabilidade e instruções de armazenamento: de não ser processado rapidamente o soro pode ser conservado sob refrigeração (2-10°C) até 3 dias ou uma semana congelado.

Interferências

Não são observadas interferências por bilirrubina até 100 mg/L nem hemólise ligeira e em nenhum dos casos apresenta-se turbidez por quilomícrons. Referência bibliográfica de Young para efeitos de drogas neste método.

Material necessário (não fornecido)

- Espectrofotômetro ou fotocolorímetro.
- Micropipetas e pipetas para medir os volumes indicados.
- Tubos ou cubetas espectrofotométricas.
- Banho-maria a 37°C.
- Relógio ou timer.

Condições de reação

- Comprimento de onda: 540 nm em espectrofotômetro ou em fotocolorímetro com filtro verde (520-560 nm).
- Temperatura de reação: 37°C
- Tempo de reação: 15 minutos
- Volume de amostra: 20 µL
- Volume de Reagente A: 2,0 mL (vide "Desempenho")
- Volume final de reação: 2,02 mL

Procedimento

Em três tubos marcados B (Branco), P (Padrão) e D (Desconhecido), colocar:

	B	P	D
Padrão	-	20 µL	-
Amostra	-	-	20 µL
Reagente A	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL

Misturar. Incubar 15 minutos a 37°C. Ler em espectrofotômetro a 540 nm ou em fotocolorímetro com filtro verde (520-560 nm) zerando o aparelho com Branco de Reagente.

Estabilidade da mistura de reação final

A cor é estável 12 horas devendo ler a absorbância dentro deste período de tempo.

Cálculos dos resultados

$$\text{Proteínas totais (g/dL)} = D \times f \quad f = \frac{\text{P.T. (g/dL)}^*}{P}$$

*Concentração de proteínas totais no Padrão

$$\text{Relação A/G} = \frac{\text{Albumina (g/dL)}}{\text{P.T. (g/dL) - Alb. (g/dL)}}$$

Exemplo:

(Os dados apresentados a seguir são ilustrativos)

Absorbância da amostra: 0,213

Absorbância do Padrão: 0,170

Se a concentração de proteínas totais no Padrão é 5,11 g/dL:

$$\text{Fator} = \frac{5,11 \text{ g/dL}}{0,170} = 30,1$$

Proteínas totais (g/dL) = 0,213 x 30,1 = 6,41 g/dL

Relação A/G

Concentração de proteínas totais na amostra = 6,41

Concentração de albumina na amostra = 3,65

$$\text{Relação A/G} = \frac{3,65}{6,41 - 3,65} = \frac{3,65}{2,76} = 1,35$$

Curva de calibração

Para conferir o bom desempenho do aparelho e ter uma resposta linear nos comprimentos de onda fixadas para as reações, pode-se preparar uma curva com quantidades crescentes de Padrão (ex. 20 e 40 µL) com um volume de Reagente A de 2,0 mL em todos os casos. Se os valores obtidos para o segundo tubo fogem de 5% dos calculados conforme à leitura do primeiro deve ser utilizado para os cálculos a curva de calibração.

Conversão de unidades ao sistema SI

Proteínas totais (g/dL) x 10 = Proteínas totais (g/L)

Método de controle de qualidade

Processar 2 níveis de um material de controle de qualidade (**Laborcontrol 1** e **Laborcontrol 2** da Laborlab) com concentrações conhecidas de proteínas totais, com cada determinação.

Valores de referência

Foi determinado o conteúdo de proteínas totais em soro de pessoas saudáveis, de ambos os sexos, com hábitos alimentares normais e idades entre 17 e 40 anos. Foram obtidos os seguintes dados:

Proteínas totais: 6,1 a 7,9 g/dL
Relação A/G: 1,2 a 2,2
Recomenda-se que cada laboratório estabeleça seus próprios valores de referência.

Limitações do procedimento

Vide “Interferências”.
Pode ser utilizado plasma como amostra, mas o resultado da proteinemia será incrementado em 0,2 g/dL pela presença de fibrinogênio.

Desempenho		
a) Reprodutibilidade: processando réplicas das mesmas amostras em diferentes dias obtiveram-se os seguintes resultados:		
Nível	D.P.	C.V.
4,6 g/dL	± 0,022 g/dL	0,49 %
5,8 g/dL	± 0,023 g/dL	0,56 %
7,0 g/dL	± 0,028 g/dL	0,39 %

b) **Recuperação:** adicionando quantidades conhecidas de proteínas a diferentes amostras se obteve uma recuperação de 96 a 103%.
c) **Limite de detecção:** dependendo do fotômetro utilizado e da comprimento de onda, conforme com a sensibilidade necessária para um ΔA mínimo de 0,001, a menor mudança de concentração detectável será de 0,01 g/dL.
d) **Linearidade:** a reação é linear até 17 g/dL. Se o aparelho utilizado na leitura teve-se baixa sensibilidade fotocolorimétrica, pode empregar-se 20 uL de amostra com 1,5 mL de Reagente A. Neste caso a linearidade chega até 12 g/dL de proteínas totais.

Parâmetros para analisadores automáticos

Para a programação do aparelho consulte o manual de uso do analisador a ser utilizado.
Para a calibração, pode-se utilizar Laborcal da Laborlab.

Apresentação

1 x 250 mL **Reagente A**
1 x 1,8 mL **Padrão**
(Cód. 1770260)

10 x 20 mL **Reagente A**
1 x 1,8 mL **Padrão**
(Cód. 1779630)

Referência

- Gasbarro, L.; Bandinelli R. & Tomassini, G. - Clin. Chim. Acta 36/1:275 (1972).
- Strickland, R.D.; Freeman, M.L. & Gurule E.T. - Anal. Chem. 33:545 (1961).
- Pastewka, J. W. & Ness, A.T. - Clin. Chim. Acta 12:523 (1965).
- Peters, T. Jr. - Clin. Chem. 14:1147 (1968).
- Henry, R., Sobel, C. & Berkman, S. - Anal. Chem. 29/10:1491 (1957).
- Kachmar, J.F. - Fundamentals of Clinical Chemistry - Tietz, Saunders, pág. 177 (1970).
- Rojkin, M.L.; Olguín de Mariani, M.C.; Drappo, G.A. y Sosa, C.F. - Bioq. del Atlántico VI/63: 1931 (1974).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACCC Press, 4th ed., 2001.

Termo de garantia

Este Kit como um todo tem garantia de troca, desde que esteja dentro do prazo de validade e seja comprovado pelo Departamento Técnico da Laborlab Produtos para Laboratórios Ltda. que não houve falhas técnicas na execução e manuseio deste kit, assim como em sua conservação.

SÍMBOLOS

Este produto preenche os requisitos da Diretiva Européia 98/79 CE para dispositivos médicos de diagnóstico "in vitro"

EC

REP

Representante autorizado na Comunidade Européia

IVD

Uso médico-diagnóstico "in vitro"

Conteúdo suficiente para <n> testes

Data de validade

Limite de temperatura (conservar a)

Não congelar

Risco biológico

Volume após da reconstituição

Cont.

Conteúdo

LOT

Número de lote

Elaborado por:

Nocivo

Corrosivo / Caústico

Irritante

Consultar as instruções de uso

Calibr.

Calibrador

CONTROL

Controle

CONTROL +

Controle Positivo

CONTROL -

Controle Negativo

REF

Número de catálogo

Fin y uso

Método colorimétrico para la determinación de proteínas totales en suero

Significación clínica

Las proteínas son compuestos orgánicos macromoleculares, ampliamente distribuidos en el organismo, esenciales para la vida. Actúan como elementos estructurales y de transporte y aparecen bajo la forma de enzimas, hormonas, anticuerpos, factores de coagulación, etc.

En el plasma, las proteínas contribuyen a mantener el volumen del fluido circulante, transportan sustancias relativamente insolubles y actúan en la inactivación de compuestos tóxicos y en la defensa contra agentes invasores.

La determinación de proteínas totales es útil para el monitoreo de cambios ocasionados por diversos estados de enfermedad. En condiciones patológicas como pérdidas renales, desnutrición, infecciones prolongadas, etc., suelen presentarse hipoproteinemias, mientras que en otras como mieloma múltiple, endocarditis bacteriana y hemoconcentración de diversos orígenes, (ej.: deshidratación) se observan hiperproteinemias.

Fundamentos del método

Los enlaces peptídicos de las proteínas reaccionan con el ión cúprico en medio alcalino, para dar un complejo color violeta con máximo de absorción a 540 nm, cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas totales en la muestra.

Reactivos provistos

A. Reactivo A: complejo EDTA/Cu 13 mmol/l en hidróxido de sodio 875 mmol/l y alquil aril poliéter (AAP).

S. Standard: solución de globulinas en estado nativo. La concentración se especifica de acuerdo al lote.

Instrucciones para su uso

Reactivos Provisos: listos para usar.

Precauciones

Los Reactivos Provisos son para uso diagnóstico "in vitro".

El Reactivo A es corrosivo. H319: Provoca irritación ocular grave. H314: Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. P262: Evitar el contacto con los ojos, la piel o la ropa. P305 + P351 + P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir enjuagando. P302 + P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes. P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de análisis clínicos. Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

Estabilidad e instrucciones de almacenamiento

Reactivos Provisos: es estable a temperatura ambiente (15-30°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

Muestra

Suero

a) Recolección: debe obtenerse suero libre de hemólisis.

b) Aditivos: no se requieren.

c) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: si no se procesa inmediatamente el suero puede conservarse hasta 3 días en refrigerador (2-10°C) o una semana en congelador.

Interferencias

No se observa interferencia por bilirrubina hasta 100 mg/l, ni hemólisis ligera y en ningún caso se presenta turbiedad por quilomicrones.

Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

Material requerido (no provisto)

- Espectrofotómetro o fotocolorímetro.
- Micropipetas y pipetas para medir los volúmenes indicados.
- Tubos o cubetas espectrofotométricas.
- Baño de agua a 37°C.
- Reloj o timer.

Condiciones de reacción

- Longitud de onda: 540 nm en espectrofotómetro o en fotocolorímetro con filtro verde (520-560 nm).

- Temperatura de reacción: 37°C
- Tiempo de reacción: 15 minutos
- Volumen de muestra: 20 ul
- Volumen de Reactivo A: 2,0 ml (Ver PERFORMANCE)
- Volumen final de reacción: 2,02 ml

Procedimiento

En tres tubos marcados B (Blanco), S (Standard) y D (Desconocido), colocar:

	B	S	D
Standard	-	20 ul	-
Muestra	-	-	20 ul
Reactivo A	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml

Mezclar con varilla. Incubar durante 15 minutos a 37°C. Leer en espectrofotómetro a 540 nm o en fotocolorímetro con filtro verde (520-560 nm) llevando a cero con el Blanco de Reactivo.

Estabilidad de la mezcla de reacción final

El color de la reacción es estable durante 12 horas por lo que la absorbancia debe ser leída dentro de ese lapso.

Cálculo de los resultados

$$\text{Proteínas totales (g/dl)} = D \times f \quad f = \frac{\text{P.T. (g/dl)}^*}{S}$$

*Concentración de proteínas totales en el Standard

$$\text{Relación A/G} = \frac{\text{Albúmina (g/dl)}}{\text{P.T. (g/dl)} - \text{Alb. (g/dl)}}$$

Ejemplo:

(Los datos presentados a continuación son ilustrativos)

Absorbancia de la muestra: 0,213

Absorbancia del Standard: 0,170

Si la concentración de proteínas totales en el Standard es 5,11 g/dl:

$$\text{Factor} = \frac{5,11 \text{ g/dl}}{0,170} = 30,1$$

$$\text{Proteínas totales (g/dl)} = 0,213 \times 30,1 = 6,41 \text{ g/dl}$$

Relación A/G

Concentración de proteínas totales en la muestra = 6,41

Concentración de albúmina en la muestra = 3,65

$$\text{Relación A/G} = \frac{3,65}{6,41 - 3,65} = \frac{3,65}{2,76} = 1,35$$

Curva de calibración

Para constatar que el fotocolorímetro tenga una respuesta lineal en la longitud de onda fijada para la reacción, puede prepararse una curva de calibración con cantidades crecientes de Standard (ej.: 20 y 40 ul) con un volumen de Reactivo A de 2,0 ml en todos los casos. Si el valor obtenido para el segundo tubo se aparta en más de un 5% del calculado de acuerdo a la lectura del primero debe emplearse para los cálculos la curva de calibración.

Conversión de unidades al sistema SI

$$\text{Proteínas totales (g/dl)} \times 10 = \text{Proteínas totales (g/l)}$$

Método de control de calidad

Procesar 2 niveles de un material de control de calidad (**Laborcontrol 1** y **Laborcontrol 2** de Laborlab) con concentraciones conocidas de proteínas totales, con cada determinación.

Valores de referencia

Se determinó el contenido de proteínas totales en suero de personas sanas, de ambos sexos, con alimentación mixta normal y edades entre 17 y 40 años.

Se obtuvieron los siguientes rangos:

Proteínas totales: 6,1 a 7,9 g/dl

Relación A/G: 1,2 a 2,2

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

Limitaciones del procedimiento

Ver Interferencias.

Puede usarse plasma como muestra, pero el resultado de la proteinemia estará incrementado en 0,2 g/dl debido a la presencia de fibrinógeno, que no está considerado dentro de la definición de Proteínas Totales.

Performance

a) Reproducibilidad: procesando replicados de las mismas muestras en distintos días se obtuvieron los siguientes resultados:

Nivel	D.S.	C.V.
4,6 g/dl	± 0,022 g/dl	0,49 %
5,8 g/dl	± 0,023 g/dl	0,56 %
7,0 g/dl	± 0,028 g/dl	0,39 %

b) Recuperación: agregando cantidades conocidas de proteínas a distintas muestras se obtuvo una recuperación de 96 a 103 %.

c) Límite de detección: depende del fotómetro empleado y de la longitud de onda. De acuerdo con la sensibilidad requerida para un ΔA mínimo de 0,001, el menor cambio de concentración detectable será de 0,01 g/dl.

d) Linealidad: la reacción es lineal hasta 17 g/dl.

Si el instrumento usado en la lectura tuviese baja sensibilidad fotocolorimétrica, puede emplearse 20 μ l de muestra con 1,5 ml de Reactivo A. En este caso la linealidad alcanza a 12 g/dl de proteínas totales.

Parámetros para analizadores automáticos

Para las instrucciones de programación consulte el manual del usuario del analizador en uso.

Para la calibración, se puede utilizar **Laborcal** de Laborlab.

Presentación

1 x 250 mL **Reactivo A**

1 x 1,8 mL **Standard**

(Cód. 1770260)

10 x 20 mL **Reactivo A**

1 x 1,8 mL **Standard**

(Cód. 1779630)

Bibliografía

- Gasbarro, L.; Bandinelli R. & Tomassini, G. - Clin. Chim. Acta 36/1:275 (1972).
- Strickland, R.D.; Freeman, M.L. & Gurule E.T. - Anal. Chem. 33:545 (1961).
- Pastewka, J. W. & Ness, A.T. - Clin. Chim. Acta 12:523 (1965).
- Peters, T. Jr. - Clin. Chem. 14:1147 (1968).
- Henry, R., Sobel, C. & Berkman, S. - Anal. Chem. 29/10:1491 (1957).
- Kachmar, J.F. - Fundamentals of Clinical Chemistry - Tietz, Saunders, pág. 177 (1970).
- Rojkin, M.L.; Olguín de Mariani, M.C.; Drappo, G.A. y Sosa, C.F. - Bioq. del Atlántico VI/63: 1931 (1974).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4th ed., 2001.

SIMBOLOS



Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"



Representante autorizado en la Comunidad Europea



Uso diagnóstico "in vitro"



Contenido suficiente para <n> ensayos



Fecha de caducidad



Límite de temperatura (conservar a)



No congelar



Riesgo biológico



Volumen después de la reconstitución



Contenido



Número de lote



Elaborado por:



Nocivo



Corrosivo / Cáustico



Irritante



Consultar instrucciones de uso



Calibrador



Control



Control Positivo



Control Negativo



Número de catálogo



Produtos para Laboratórios Ltda.
Estrada do Capão Bonito, 489
Guarulhos - SP- Brasil - CEP: 07263-010
CNPJ: 72.807.043/0001-94
Atendimento ao cliente:
+55 (11) 2480 0529/+55 (11) 2499 1277
sac@laborlab.com.br
www.laborlab.com.br