

FINALIDADE

Sistema colorimétrico para determinação da aldolase no soro.
Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO

A enzima Aldolase atua sobre a Frutose 1,6 Difosfato, desdobrando-a em duas triosefosfatos: Gliceraldeído Fosfato e Dihidroxiacetona Fosfato. Essas, frente à hidrazina em meio alcalino, dão origem às respectivas hidrazonas que, coradas, permitem então dosagem colorimétrica da aldolase.

PARTICULARIDADES DO SISTEMA

Doles Reagentes apresenta uma simplificação da dosagem da Aldolase, segundo a técnica de Sibley e Lehninger. O substrato apresenta-se liofilizado, o que lhe confere estabilidade. As manipulações técnicas são poucas, não havendo passagem crítica. Um simples fator permite o cálculo em unidades internacionais (U.I.). O tempo total gasto é de 60 minutos.

METODOLOGIA

Sibley - Lehninger modificado.

REAGENTES

Substrato: cada flaconete contém 44µmol de Frutose 1,6 Difosfato e 5mg de Albumina bovina como estabilizante.

Solução tampão pH 7,4: Tris 0,05M pH 7,4.

Sulfato de Hidrazina: solução de Sulfato de Hidrazina 1M, pH 7,4.

Ácido Tricloroacético 0,61M: solução de Ácido Tricloroacético 0,61M.

Reagente de cor: solução 0,005M de 2,4 Dinitrofenilhidrazina em Ácido Clorídrico 2M.

Hidróxido de Sódio (concentrado): solução de Hidróxido de Sódio 10M.

Solução padrão 40 U.I./L: cada mL da solução padrão corresponde a 40 U.I./L de Aldolase.

APRESENTAÇÃO

| | |
|----------------------------------|-------------|
| Substrato | 10 x 32,4mg |
| Solução tampão pH 7,4 | 1 x 42mL |
| Sulfato de Hidrazina | 1 x 3mL |
| Ácido Tricloroacético 0,61M | 1 x 46mL |
| Reagente de cor | 1 x 26mL |
| Hidróxido de Sódio (concentrado) | 1 x 37,5mL |
| Solução padrão 40 U.I./L | 1 x 6mL |

NÚMERO DE TESTES

10 testes / 200µL de amostra

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

EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS

- Espectrofotômetro ou fotocolorímetro capaz de medir a absorvância em 540nm ou filtro verde.
- Tubos de ensaio.
- Pipetas graduadas.
- Pipeta semiautomática 200µL.
- Ponteiras descartáveis.
- Água destilada ou deionizada.
- Banho maria (37°C).
- Cronômetro.
- Centrífuga.
- Frasco plástico de 500mL.
- Balão volumétrico de 500mL.

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Substrato: armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, se obedecidas as condições de armazenamento.

Solução tampão pH 7,4: armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, se obedecidas as condições de armazenamento.

Sulfato de Hidrazina: armazenar à temperatura de 2-30°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, se obedecidas as condições de armazenamento.

Ácido Tricloroacético 0,61M: armazenar à temperatura de 2-30°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, se obedecidas as condições de armazenamento.

Reagente de cor: armazenar à temperatura de 2-30°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, se obedecidas as condições de armazenamento.

Hidróxido de Sódio (concentrado): armazenar à temperatura de 2-30°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, se obedecidas as condições de armazenamento.

Hidróxido de Sódio 0,75M: armazenar à temperatura de 20-30°C. Estável por 3 anos, se obedecidas as condições de armazenamento e preparo.

Solução padrão 40 U.I./L: armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, se obedecidas as condições de armazenamento.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES COM O USO DOS REAGENTES

Os reagentes são somente para **uso diagnóstico *in vitro***. Seu manuseio deve ser cuidadoso, evitando-se contato com pele e mucosas. **A solução de uso (Hidróxido de Sódio 0,75M) é cáustica. O reagente de cor, contendo Ácido Clorídrico, e a solução de Ácido Tricloroacético 0,61M deverão ser manuseados com cuidados inerentes ao uso de ácidos.** Usar pera para pipetagem. 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 e plasma. A aldolase permanece estável no soro por 2 dias, à temperatura de 20-25°C; por 20 dias, à temperatura de 2-8°C e por 3 meses, no mínimo, à temperatura de 20°C negativos. Como as hemácias são ricas em aldolase, o soro deve estar isento de hemólise.

Todas as amostras biológicas devem ser consideradas como potencialmente infectantes.

PROCEDIMENTO TÉCNICO

Preparo da solução de Hidróxido de Sódio 0,75M

Transferir a **solução concentrada de Hidróxido de Sódio** para um balão volumétrico de 500mL e ajustar o volume à marca com água destilada. Guardar em vasilhame plástico. Estável por 3 anos, à temperatura de 20-30°C.

Preparo do substrato para uma dosagem

A um frasco de substrato, adicionar **4mL da solução tampão** e agitar até dissolver.

Identificar 2 tubos de ensaio com **B (branco)** e **T (teste)**.

Proceder como segue:

| | B | T |
|-----------------------------|---------|---------|
| Substrato | 1,7mL | 1,7mL |
| Sulfato de Hidrazina | 2 gotas | 2 gotas |

Colocar em banho maria, durante 5 minutos, a 37°C.

| Amostra | B | T |
|---------|---|-------|
| | - | 200µL |

Incubar durante 30 minutos, à temperatura de 37°C.

| Ácido Tricloroacético 0,61M | B | T |
|-----------------------------|-------|-----|
| | 2mL * | 2mL |
| Amostra | 200µL | - |

* Ao se adicionar o Ácido Tricloroacético 0,61M ao tubo B observa-se uma turvação. Esta é devida à presença de albumina bovina na solução de substrato. Não há interferência nos resultados.

Centrifugar em rotação maior que 3000 rpm, os 2 tubos e transferir para 2 novos tubos rotulados com B e T.

Proceder como segue:

| | B | T |
|------------------------------------|-----|-----|
| Sobrenadante etapa anterior | 1mL | 1mL |
| Hidróxido de Sódio 0,75M | 1mL | 1mL |

Deixar repousar por 10 minutos à temperatura ambiente (20-30°C).

| | B | T |
|------------------------|-----|-----|
| Reagente de cor | 1mL | 1mL |

Colocar em banho maria a 37°C, durante 10 minutos. Após o período de incubação, retirar do banho maria e proceder conforme o descrito abaixo.

| | B | T |
|---------------------------------|-----|-----|
| Hidróxido de Sódio 0,75M | 7mL | 7mL |

Homogeneizar e deixar repousar, durante 3 minutos, à temperatura ambiente (20 a 30°C).

Ler a absorvância do tubo T, em espectrofotômetro ou fotocolorímetro, em 540nm ou filtro verde. Acertar o zero com o tubo B. A cor final permanece estável por 10 minutos à temperatura ambiente (20 a 30°C).

DETERMINAÇÃO DO FATOR (F)

Identificar 2 tubos de ensaio com B (branco) e T (teste).

Proceder como segue:

| | B | T |
|------------------------------------|---------|---------|
| Água destilada | 1,9mL | 0,9mL |
| Sulfato de Hidrazina | 2 gotas | 2 gotas |
| Solução Padrão | - | 1,0mL |
| Ácido Tricloroacético 0,61M | 2mL | 2mL |

Homogeneizar. Rotular, novamente, dois tubo B e P. Proceder como segue:

| | B | T |
|----------------------------------|-----|-----|
| Líquido da etapa anterior | 1mL | 1mL |
| Hidróxido de Sódio 0,75M | 1mL | 1mL |
| Reagente de Cor | 1mL | 1mL |

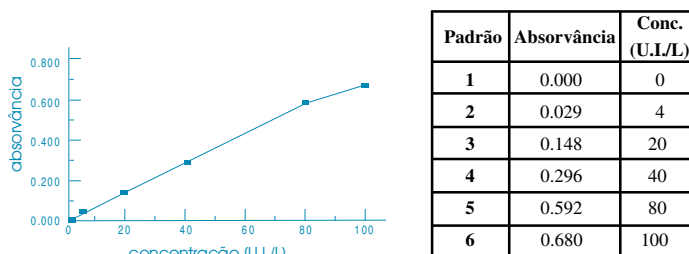
Colocar em banho maria, a 37°C, durante 10 minutos. Após o período de incubação, retirar do banho maria e proceder conforme o descrito abaixo.

| | B | T |
|---------------------------------|-----|-----|
| Hidróxido de Sódio 0,75M | 7mL | 7mL |

Homogeneizar e deixar repousar, durante 3 minutos, à temperatura ambiente (20 a 30°C)

Ler a absorvância do tubo P, em espectrofotômetro ou fotocolorímetro, em 540nm ou filtro verde. Acertar o zero com o tubo B. A cor final permanece estável por 10 minutos à temperatura ambiente (20 a 30°C).

CURVA DE CALIBRAÇÃO



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 540nm 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.
- **A reação é linear até 80U.I./L (ver curva acima). Para valores mais elevados, diluir a amostra com solução fisiológica e proceder a uma nova dosagem. Multiplicar o valor encontrado pelo fator de diluição.**
- **O kit de Aldolase 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.**
- **O fator deverá ser refeito periodicamente a cada lote do produto.**
- As soluções padrão utilizadas na montagem da curva de calibração foram preparadas segundo descrito em "Aldolase I. Colorimetric Determination, Patrick C. Pinto e colaboradores, Clin. Chem. Vol.15 pag.339-348 (1969)".



CÁLCULOS

Aldolase (U.I./L) = absorvância do teste x fator (F)

$$\text{Fator (F)} = \frac{40}{\text{absorvância padrão}}$$

Exemplo:

Leituras:

Padrão: 0,296

Teste: 0,060

$$F = \frac{40}{0,296} = 135$$

Aldolase (U.I./L) = 0,060 x 135 = 8,0

EXPRESSÃO DOS RESULTADOS EM UNIDADES S.I.

- Os valores são expressos em U.I./L (S.I.)
- Uma U.I./L equivale a 0,75un. Sibley - Lehninger (S.L.). Para exprimir os resultados em unidades S.L., basta multiplicar por 1,34 os valores encontrados em U.I./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.
- Não usar amostras hemolisadas.
- Algumas drogas podem elevar os níveis de aldolase. Dentre elas estão incluídos, principalmente, os agentes hepatotóxicos.
- As fenotiazinas podem diminuir os níveis séricos de aldolase.
- A aldolase é uma enzima encontrada em várias vísceras e nas musculaturas lisa e estriada. A universalização dessa enzima no organismo faz com que a aldolase apresente-se aumentada sempre que haja lesão ou destruição de tecidos, carecendo de especificidade.
- A aldolase encontra-se aumentada nas distrofias musculares de origem não neurogênicas. Na distrofia muscular progressiva (distrofia de Duchenne), apresenta-se com valores elevados, que podem atingir a 100 ou mais U.I./litro.
- Ao se adicionar o Ácido Tricloroacético 0,61M ao tubo B observa-se uma turvação. Esta é devida à presença de albumina bovina na solução de substrato. Não há interferência nos resultados.

CONTROLE DA QUALIDADE DO SISTEMA

- 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. Não usar detergente à base de fosfato.
- A água utilizada na limpeza do material, no preparo dos reagentes e na dosagem, deve ser de boa qualidade.
- Colunas deionizadoras saturadas liberam íons diversos, amins e agentes oxidantes, que deterioram os reagentes.
- As pipetagens devem ser precisas.
- O nível da água do banho-maria deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio e a temperatura (37°C) rigorosamente observada.
- 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 e outro soro controle de valor elevado.

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:

Adultos - 3 - 7 U.I./L.

A atividade sérica da enzima varia com a idade (ver tabela anexa).

ALDOLASE SÉRICA LIMITES SUPERIORES DA NORMALIDADE

| Idade (anos) | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 14 | 16 | Adultos |
|-------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---------|
| Atividade (U.I./L) (média) | 17 | 15 | 13 | 12 | 11 | 10 | 9 | 8 | 7 | 6,6 |

SIGNIFICADO CLÍNICO

A aldolase sérica encontra-se aumentada nas hepatopatias, onde há destruição do hepatócito. Aumentos significativos são encontrados em patologias com ocorrência de lesão da musculatura estriada (infarto do miocárdio, distrofia muscular progressiva, etc.). Valores elevadíssimos de aldolase são encontrados nas fases iniciais da distrofia muscular progressiva. Com a atrofia progressiva da massa muscular e sua substituição por tecido gorduroso, os níveis de aldolase sérica caem progressivamente, mantendo-se, no entanto, sempre acima da normalidade.

O aumento da aldolase sérica é uma constante nas carcinomatoses.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Foram realizados 44 testes em amostras cujo teor de Aldolase situava-se no intervalo de 1,8 a 22,3U.I./L. A comparação do kit de Aldolase Doles (Y) com um método de referência (X) deu origem à seguinte equação de regressão linear: $Y = 1,033X - 0,25$, sendo o coeficiente de correlação 0,99.

Adição da enzima aldolase (Sigma prod. A7145 - enzima procedente da musculatura estriada de coelho) em concentração equivalente a 6 U.I./L em soros cujas concentrações oscilaram entre 2,0 e 6,8 U.I./L, originou uma recuperação de $98 \pm 5\%$.

Repetitividade: foram realizadas 20 dosagens sucessivas, em duas amostras, obtendo-se os seguintes resultados:

| | Amostra 1 | Amostra 2 |
|------------------------------|-----------|-----------|
| Concentração-média (U.I./L) | 2,225 | 7,675 |
| Desvio padrão(U.I./L) | 0,174 | 0,297 |
| Coefficiente de variação (%) | 7,83 | 3,87 |

Reprodutibilidade: foram realizadas 20 dosagens, durante 20 dias consecutivos, em duas amostras, obtendo-se os seguinte resultados:

| | Amostra 1 | Amostra 2 |
|------------------------------|-----------|-----------|
| Concentração-média (U.I./L) | 2,455 | 8,015 |
| Desvio padrão (U.I./L) | 0,198 | 0,321 |
| Coefficiente de variação (%) | 8,09 | 4,01 |

Especificidade: a presente metodologia é específica para a dosagem da aldolase no soro e plasma.

Sensibilidade: a absorvância encontrada, de 0,010, corresponde a 1,35 U.I./L de concentração de Aldolase, quando realizados os testes em espectrofotômetro, a 540nm. 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 Sibley - Lehninger.

Substâncias interferentes: anticoagulantes tais como: oxalato, fluoreto e heparina, não interferem na atividade enzimática da aldolase.

A concentração de aldolase apresenta-se dez vezes maior nas hemácias do que no soro. Para evitar difusão das enzimas das hemácias, o soro deve ser separado tão logo haja coagulação total do sangue. Não utilizar soro com sinais de hemólise.

Certas drogas podem alterar os níveis de aldolase. Para controle de tal interferência, recomenda-se que o paciente seja questionado quanto ao uso de medicamentos.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Sibley, J.A. e Lehninger, A.L.: *Determination of aldolase in animal tissue*, J. Biol. Chem. 177,859 (1949).
- Jacobs L.L.S.; Kasten B.L.; Demott W.R.; Wolfson W.L.: *Laboratory Test Handbook*, 2ª ed; 67-68, 1990.
- Kaplan L.A.; Pesce A.J.: *Métodos de Química Clínica*, 884 - 888, 1990.
- Chernecky C.C.; Krech R.L.; Berger B.J.: *Laboratory Tests and Diagnostic Procedures*, 163, 1993.
- Burtis C.A.; Ashcolood, Tietz: *Textbook of Clinical Chemistry*, 2ª ed; 2.177; 1994.
- 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
email: doles@doles.com.br

M.S.: nº 10231810047

Revisão: 14 (06/2009)

NBR ISO 9001

**Sistema da Qualidade
certificado desde 1999**

