

FINALIDADE

Sistema colorimétrico para determinação do cálcio no soro, plasma e urina.

Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO

O cálcio é determinado colorimetricamente através de um complexo corado com Cresolftaleína em meio alcalino.

PARTICULARIDADES DO SISTEMA

O kit Doles para dosagem de Cálcio possui um único reagente. Seu preparo é simples, sendo suficiente adicionar o reagente de cor à água. Após o preparo, o excesso de reagente pode ser usado como branco nas reações.

METODOLOGIA

Doles.

REAGENTES

Reagente de cor (concentrado): Dietanolamina 5,7M, Dietilamina 4,3M, 8-Hidroxiquinolina 0,019M, o-Cresolftaleína complexona 0,00025M e estabilizantes por litro.

Solução padrão 10mg/dL: solução de cálcio 10mg/dL.

APRESENTAÇÃO

Reagente de cor (concentrado) 1 x 100mL
Solução padrão 10mg/dL 1 x 3mL

NÚMERO DE TESTES

Manual 280 testes

EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS

- Espectrofotômetro ou fotocolorímetro capaz de medir a absorvância em 570nm ou filtro laranja.
- Tubos de ensaio.
- Pipetas graduadas.
- Pipeta semiautomática 20µL.
- Cronômetro.
- Ponteiras descartáveis.
- Água deionizada.
- Pera para pipetagem.

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Reagente de cor (concentrado): 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 padrão 10mg/dL: 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

Todos os reagentes são somente para **uso diagnóstico *in vitro***. Os reagentes são corrosivos. Devem ser manuseados com cuidado, evitando contato com pele e mucosas. **O reagente de cor concentrado não deve ser pipetado com a boca pois pode provocar queimaduras. Usar pera de pipetagem.** Havendo contaminação acidental lavar a parte 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:



Venenoso



Corrosivo



Irritante

AMOSTRA

Soro ou plasma (colhido com heparina) e urina. O sangue deve ser colhido sem estase venosa para evitar variações na concentração de cálcio ligado a proteínas. Separar o soro ou plasma imediatamente.

A coleta da urina de 24 horas deve ser feita em frasco contendo 10mL de ácido clorídrico p.a.. Quando da dosagem do cálcio urinário, se necessário, acidificar a urina a pH 1-2 (1 a 2 gotas de Ácido Clorídrico p.a para 5mL de urina).

Todas as amostras biológicas devem ser consideradas como potencialmente infectantes.

PROCEDIMENTO TÉCNICO

Preparo do reagente de cor de uso:

Por não ser estável, o reagente de cor de uso deve ser preparado no momento de sua utilização e apenas em quantidade necessária para os testes.

A um tubo de ensaio (**B**), adicionar **7,0mL de água deionizada e 1,0mL do reagente de cor (concentrado)**. Homogeneizar. A quantidade do reagente de cor de uso poderá ser modificada de acordo com as necessidades, obedecidas as proporções mencionadas acima.

No preparo do reagente de cor de uso, se a solução final ficar azulada significa que houve contaminação da água por íons de cálcio. Providenciar nova fonte de água destilada ou deionizada.

Rotular 2 tubos de ensaio com **T (teste) e P (padrão)**.

Proceder como segue:

	T	P
Reagente de cor (uso)	2,5mL	2,5mL
Amostra	20µL	-
Solução padrão	-	20µL

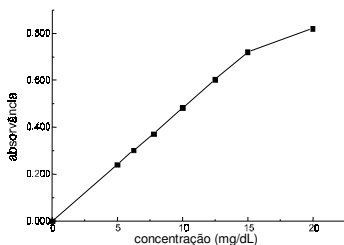
Homogeneizar e ler as absorvâncias de **teste (T) e padrão (P)** em espectrofotômetro ou fotocolorímetro, em **570nm** ou **filtro laranja**, zerando o aparelho com o **branco (B)**. O **branco** é representado pelo volume de reagente (3mL) que resta no **tubo (B)** após o preparo do reagente de uso.

DETERMINAÇÃO DO CÁLCIO NA URINA

1. Acidificar a urina, a pH 1-2, com Ácido Clorídrico p.a. (1 a 2 gotas de HCl para 5mL de urina).
2. Proceder à dosagem de maneira idêntica à dosagem do soro.



CURVA DE CALIBRAÇÃO



Padrão	Absorvância	Conc. (mg/dL)
1	0.000	0
2	0.240	5
3	0.301	6.25
4	0.372	7.8
5	0.482	10
6	0.603	2.5
7	0.720	15
8	0.820	20

Obs.: Não utilizar esta curva para determinar 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 570nm 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 15mg/dL (ver curva acima). Obtendo-se valores mais elevados, dilui-se a amostra com água deionizada e procede-se à nova dosagem. Multiplicar o valor encontrado pelo fator de diluição.**
- O kit de Cálcio 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 e a cada lote do produto.**
- As soluções padrão utilizadas na montagem da curva de calibração foram rastreadas contra "Standard Calcium 10mg/dL, cat. n° 360-5 Sigma Chemical Company"

CÁLCULOS

Determinação do cálcio no soro ou plasma

$$Ca \text{ (mg/dL)} = \frac{\text{absorvância teste}}{\text{absorvância padrão}} \times 10$$

Exemplo:

Leituras:

Padrão (P) = 0,482

Teste (T) = 0,410

$$\text{Cálcio (mg/dL)} = \frac{0,410}{0,482} \times 10 = 8,5$$

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

$$\text{Fator (F)} = \frac{10}{\text{absorvância}}$$

Cálcio (mg/dL) = absorvância teste x F

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

Exemplo:

Leituras:

Padrão (P) = 0,483; 0,481; 0,482

Teste (T) = 0,410

$$\text{Média aritmética} = \frac{0,483 + 0,481 + 0,482}{3} = 0,482$$

$$\text{Fator (F)} = \frac{10}{0,482} = 20,74$$

$$\text{Cálcio (mg/dL)} = 0,410 \times 20,74 = 8,5$$

DETERMINAÇÃO DO CÁLCIO IONIZADO

O cálcio ionizado pode ser determinado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Cálcio ionizado (mg/dL)} = \frac{6 \times Ca - [A + (0,19 \times Pt) / 3]}{A + (0,19 \times Pt) + 6}$$

Ca = Cálcio mg/dL

Pt = Proteínas totais (g/dL)

A = Albumina (g/dL)

Dosar as proteínas totais (g/dL), a albumina (g/dL) e o cálcio (mg/dL) da amostra. Calcular conforme exemplo a seguir:

Exemplo:

Ca = 10mg/dL

Pt = 7 g/dL

A = 4 g/dL

$$\text{Cálcio ionizado (mg/dL)} = \frac{6 \times 10 - [4 + (0,19 \times 7) / 3]}{4 + (0,19 \times 7) + 6}$$

$$\text{Cálcio ionizado} = 4,9\text{mg/dL}$$

O cálcio ionizado (livre) deve ser dosado, preferencialmente, utilizando-se o sistema de eletrodo seletivo para íon cálcio. Diversos equipamentos para tal finalidade encontram-se disponíveis no mercado.

DETERMINAÇÃO DO CÁLCIO URINÁRIO

$$\text{Cálcio urina de 24hs} = Ca \text{ (mg/dL)} \times \frac{\text{volume urinário 24hs (mL)}}{100}$$

Exemplo:

Ca (mg/dL) = 10mg/dL

Volume urinário (mL) = 1500mL

$$\text{Cálcio urina de 24hs} = 10 \times \frac{1500}{100} = 150\text{mg/24hs}$$

EXPRESSÃO DOS RESULTADOS EM UNIDADES S.I.

$$\text{Cálcio (mmol/L)} = \text{Cálcio (mg/dL)} \times 0,25$$



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 provocar resultados errôneos.
- Acetaminofen, antiácidos contendo cálcio, anticoncepcionais orais e tiazidas causam interferência, levando a resultados elevados.
- O uso de aspirina, corticoesteroides, difenilhidantoína, diuréticos, laxantes em excesso e sulfonamidas pode levar a valores diminuídos de cálcio sérico.

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 soro 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**).
6. A água utilizada no preparo do reagente de cor de uso deve ser grau reagente.
7. A causa mais comum de erro e deterioração do reagente é a contaminação da vidraria por sais de cálcio. Toda vidraria deve ser lavada apenas com detergentes não iônicos e, posteriormente, com solução de ácido clorídrico 25%. Enxaguar várias vezes com água deionizada.

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 / Plasma

Crianças	8,5 - 11 mg/dL
Adultos	8,8 - 10,6mg/dL

Cálcio ionizado

Recém-nascido	
3 - 24hs de vida:	4,3 - 5,2 mg/dL
24 - 48hs de vida:	4,0 - 4,8 mg/dL

Adultos	4,5 - 5,4 mg/dL
---------	-----------------

Urina	50 - 150mg/24hs
-------	-----------------

A excreção de cálcio urinário depende da dieta. Nas dietas ricas em cálcio, a excreção diária pode atingir a 300mg/ volume urinário 24hs.

SIGNIFICADO CLÍNICO

Podemos distinguir alterações nos níveis séricos de cálcio em vários processos patológicos.

A hipercalemia é observada nas seguintes condições: hiperparatireoidismo, uso de certos diuréticos (tiazidas), hipervitaminose D, mieloma múltiplo, osteosarcoma e nas metástases osteolíticas de carcinomas.

A hipocalcemia é registrada no hipoparatiroidismo, deficiência de vitamina D (raquitismo e osteomalacia), nas síndromes que cursam com hipomagnesemia e, por vezes, na gravidez.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Foram realizados 35 testes em amostras cujo teor de Cálcio situava-se no intervalo de 8,4 a 11,2mg/dL. A comparação do kit de Cálcio Doles (Y) com um método de referência (X) deu origem à seguinte equação de regressão linear: $Y=1,040X - 0,36$, sendo o coeficiente de correlação 0,99.

Teste de recuperação do Cálcio usando a presente metodologia foi de $98,5 \pm 3\%$.

Repetitividade: foram realizadas 20 dosagens sucessivas, em uma única amostra, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra
Média (mg/dL)	9,31
Desvio padrão	0,21
Coeficiente de variação (%)	2,26

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

	Amostra
Média (mg/dL)	10,03
Desvio padrão	0,27
Coeficiente de variação (%)	2,69

Especificidade: a presente metodologia é específica para determinação de íons Cálcio. A presença de 8-Hidroxiquinoleína no reagente impede a interferência do magnésio na dosagem.

Sensibilidade: a absorvância encontrada, de 0,024, corresponde a 0,5mg/dL de concentração de Cálcio, quando utilizado um espectrofotômetro, a 570nm. 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.

Substâncias interferentes: o uso de água não apropriada para o preparo do reagente, assim como a presença de sais de cálcio na vidraria utilizada, poderão levar a resultados falsamente elevados. Bilirrubina até 20mg/dL e magnésio a uma taxa 10 vezes superior à normal, não interferem na metodologia.

Quando se dosar o cálcio em soro hemolisado ou lipêmico, preparar um **branco** como segue:

Adicionar aproximadamente 10mg de EDTA a cerca de 400µL do soro em estudo e homogeneizar. A 2,5mL do reagente de cor de uso, adicionar 20µL desse soro. O branco do soro deverá ser subtraído da absorvância total do soro em estudo.

Certas drogas podem alterar os níveis de cálcio (ver em limitações do sistema). Para controle de tal interferência, recomenda-se que o paciente seja questionado quanto ao uso de medicamentos.



BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Connerty H.V. & Briggs A. R.: *Amer J.Clin.Path*: 45:290; 1966.
- Gitelman H. J.: *Anal. Biochem.* 18:521; 1967.
- Martinek, R.G.: *J. Am. Med. Techn.* 33:416; 1971.
- Meites, S., Faulkner. W.R.: *Selected Methods of Clinical Chemistry*, vol. 09, 125-129, 1981.
- Kaplan. L. A., Pesce. A. J.: *Química Clínica Métodos*, 1014 - 1031, 1990.
- 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

CEP: 74001-970 Goiânia - GO - Brasil

Caixa Postal 105I

e-mail: doles@doles.com.br

www.doles.com.br

M.S.: nº 10231810044

Revisão: 16 (06/2009)

NBR ISO 9001

**Sistema da Qualidade
certificado desde 1999**

